

**ТОКСИКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ЭФФЕКТИВНЫХ И
БЕЗОПАСНЫХ АНТИДОТОВ ЦИАНИДОВ. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

Гладких В.Д.

*Федеральное государственное унитарное предприятие научно-производственный
центр «Фармзащита» Федерального медико-биологического агентства, г. Химки,
Московская обл.*

Резюме. В статье на основании анализа литературных данных охарактеризованы множественные пути биотрансформации эндогенного цианида, обсуждаются токсикокинетические подходы к разработке антидотов цианидов. Акцентируется внимание на недостатках современных антидотов и рассматриваются перспективные направления совершенствования средств антидотной профилактики и терапии острых отравлений цианидами. На роль потенциальных антидотов цианидов, эффективных и безопасных при внутримышечной, ингаляционной и пероральной доставке, претендуют, прежде всего, химические соединения, опосредующие антицианидную активность за счет стимуляции основных механизмов детоксикации эндогенного цианида: сульфанген, кобинамид, производные кетоглутаровой кислоты.

Ключевые слова: антидоты; детоксикация; кобинамид; отравления; токсикокинетика; сульфанген; цианиды; α -кетоглутаровая кислота

**TOXICOKINETIC APPROACHES TO THE DEVELOPMENT OF EFFECTIVE AND
SAFE CYANIDE ANTIDOTES. EXPERIMENTAL AND THEORETICAL ASPECTS**

Gladkikh V.D.

*Federal State Unitary Enterprise Scientific and Production Center «Pharmzaschita»
Federal Medical and Biological Agency, Khimki, Moscow region*

Abstract. Based on the analysis of literature data, the article characterizes multiple biotransformation pathways of endogenous cyanide, discusses toxicokinetic approaches to the development of cyanide antidotes. Attention is focused on the shortcomings of modern antidotes and promising directions for improving antidote prevention and treatment of acute cyanide poisoning are considered. The role of potential cyanide antidotes, effective and safe for intramuscular, inhalation and oral delivery, is claimed primarily by chemical compounds mediating

anti-cyanide activity by stimulating the main mechanisms of detoxification of endogenous cyanide: sulfangene, cobinamide, ketoglutaric acid derivatives.

Keywords: antidotes; detoxification; cobinamide; poisoning; toxicokinetics; sulfangene; cyanides; α -ketoglutaric acid

Введение. Наиболее типичным соединением среди цианидов является синильная кислота (HCN), продуцируемая в результате природного абиотического и биотического синтеза, а также синтетическим путем для промышленного использования. Считается, что циан-ион (CN⁻) является гипотетическим предшественником в процессе образования аденина, гуанина и других азотных соединений, свойственных живой материи [1]. Цианид генерируется и в митохондриях нейронов опосредованной миелопероксидазой реакцией с использованием глицина в качестве субстрата [2]. Эндогенная генерация цианида модулирует окислительный обмен, цианид может функционировать и как нейромодулятор, подобно CO и NO [3].

Для связывания и нейтрализации эндогенного цианида в тканях существуют множественные пути биотрансформации, на основе которых предложены и нашли клиническое применение химические соединения различной структуры, дифференцируемые в соответствии с основными путями детоксикации цианида в организме на группы: метгемоглобинообразователи – амилнитрит, нитрит натрия, 4-диметиламинофенол (4-DMAP); стимуляторы детоксикации цианида и образования нетоксичных соединений глюкоза, донаторы сульфгидрильных групп (тиосульфат натрия), цианидные хелатирующие агенты (гидроксокобаламин, дикобальт-этилендиаминтетрауксусная кислота).

К первым антидотам цианидов относятся амилнитрит, нитрит натрия и тиосульфат натрия. Антицианидная эффективность амилнитрита в экспериментах на собаках была показана еще в 1888 году L. Pedigo, нитрита натрия – в 1929 г. Г. Младовяну и Г. Георгиу; в 1895 году Ланг для лечения острых цианидных отравлений предложил использовать серосодержащие препараты (тиосульфат натрия) [4]. В дальнейшем было показано, что ингаляция амилнитрита, внутривенное введение нитрита натрия и тиосульфата натрия оказывает выраженный потенцирующий антицианидный эффект [5]. На основании этих экспериментально-теоретических исследований был разработан первый антицианидный комплект антидотов Cyanide Antidote Kit (CAK), промышленный выпуск которого был освоен в США в 1930-х гг. и продолжался до 2012 г. В настоящее время для клинического использования в США рекомендован двухкомпонентный антицианидный набор *Nithiodote*®, содержащий флакон нитрита натрия (30 мг/мл) и флакон тиосульфата натрия (250 мг/мл).

Амилнитрит играет важную роль в лечении отравления цианидом, поскольку он является единственным противоядием, которое можно вводить до начала внутривенного доступа. Однако его применение рассматривается как временная мера, предшествующая введению нитрита натрия и тиосульфата натрия в случае подтвержденного диагноза острого отравления цианидами [6].

Нитрит натрия является более мощным индуктором метгемоглобинообразования, чем амилнитрит, а период его полувыведения из плазмы составляет от 30 до 50 мин [7-8].

В 1970-80 гг. в результате исследований аминофенолов, выполненных в Германии, были получены убедительные экспериментальные данные о преимуществах 4-DMAP по сравнению с другими метгемоглобинообразователями [1] и препарат был рекомендован для клинического применения.

Так как тиосульфат натрия слишком медленно начинает действовать, чтобы его можно было назначать отдельно без поддержки антидотов другого механизма действия, на предмет антицианидной активности был протестирован ряд серосодержащих веществ: коллоидная сера, цистин, цистеин, глутатион, тетратионат натрия, унитиол, димеркаптоянтарная кислота и др. Эти препараты оказывали определенное профилактическое или лечебное действие при отравлении цианидами, однако существенно не отличающееся от фармакологического эффекта тиосульфата натрия [1,9].

Первые предложения по использованию кобальтсодержащих препаратов для лечения острых отравлений цианистыми соединениями относятся еще к концу XIX столетия: А. Antal в 1894 г. применил азотнокислый кобальт; F. Meurice в 1900 г. – неорганические соли кобальта, образующие недиссоциирующие циан-кобальтовые соединения; в 1935 г. экспериментальными исследованиями лаборатории В. М. Карасика продемонстрирован профилактический и лечебный эффект хлористого и сернокислого кобальта при затравке мышей летальными дозами цианида натрия [10]. Экспериментально-теоретической оценке антидотных свойств органических соединений кобальта, менее токсичных и труднее диссоциирующих, чем неорганические соли, также были посвящены многочисленные исследования. Так, например, G. Paulet (1959) на основании опытов на собаках пришел к выводу о высокой защитной и лечебно-антидотной эффективности ацетат-, глютамат-, глюконат-, гистидинат кобальта и дикобальтовой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (2-Co-ЕДТА) при отравлении цианидом натрия [11]. В 1952 г. S. V. Mushett et al. впервые продемонстрировали эффективность гидроксокобаламина в качестве цианидного антидота в опытах на мышах [12].

Эффективность 2-Со-ЕДТА, как в эксперименте на животных, так и в клинической практике неоднократно обсуждалась в литературе [6,13].

В настоящее время из кобальтсодержащих препаратов в клинической практике применяются 2-Со-ЕДТА и гидроксокобаламин.

Из всех цианидных антидотов гидроксокобаламин имеет наиболее благоприятный профиль безопасности, поэтому он может использоваться эмпирически при подозрении на отравление цианидом, в том числе ингаляционные отравления продуктами горения на догоспитальном и госпитальном этапах оказания медицинской помощи [1].

Отсутствие международной гармонии в отношении эффективности и безопасности существующих цианидных антидотов [14] инициирует серьезные исследовательские усилия по разработке инновационных антидотов.

A. H. Hall, et al. [6] предложены критерии, предъявляемые к гипотетическому «идеальному» цианидному антидоту, отражающие потребности клинической токсикологии: быстрое начало действия, нейтрализация цианида без нарушения транспортных функций кислорода, наличие защитных и переносимых профилей для использования на догоспитальном этапе, безопасность применения при отравлении продуктами горения; безопасность назначения пациентам с неподтвердившимся диагнозом отравления цианидами; простота введения. На сегодняшний день ни один из существующих цианидных антидотов не отвечает этим критериям.

Немаловажным импульсом для разработки новых антидотов цианидов является потребность в простых в применении препаратах. Имеющиеся на сегодняшний день антидоты цианидов (за исключением амилнитрита) предназначены для внутривенного введения и не приспособлены для оказания экстренной медицинской помощи при групповых и массовых отравлениях. Потенциально возможными способами введения антидотов при одномоментном поступлении пораженных из очага поражения цианидами являются прежде всего: внутримышечная инъекция посредством автоинъектора и ингаляционная доставка.

В результате экспериментально-клинических исследований, выполненных в последние десятилетия, на роль потенциальных антидотов цианидов, эффективных и безопасных при внутримышечной, внутрикостной инъекциях и ингаляционной доставке, претендует ряд химических соединений, опосредующих антицианидную активность за счет стимуляции процессов детоксикации цианида.

Пути биотрансформации цианидов. К настоящему времени охарактеризованы множественные метаболические пути биотрансформации и элиминации цианида (рис.1).

Биохимические и молекулярные характеристики этих путей подробно представлены в литературе [15].

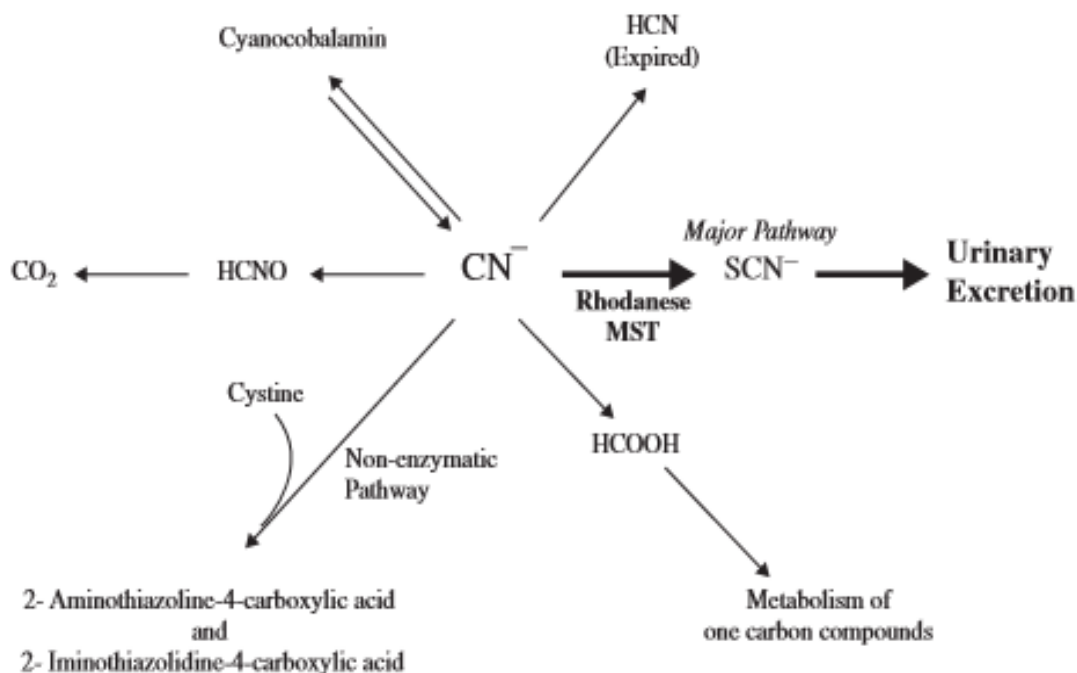


Рисунок 1 – Пути биотрансформации и элиминации цианида

При отравлении цианосодержащими соединениями некоторая часть цианида выделяется из организма в неизмененном виде с выдыхаемым воздухом, большая часть подвергается метаболическим превращениям: частично окисляется через циановую кислоту HCNO до CO_2 и аммиака, но в основном вступает в реакцию конъюгации с эндогенными серосодержащими веществами с образованием малотоксичных роданистых соединений, выделяющихся через почки и со слюной [16]. Ферментативная конверсия цианида в тиоцианат (SCN^-), катализируемая роданазой (rhodanase) либо 3-меркаптопируватсульфотрансферазой (MST), является основным путем метаболизма (рис. 1), на который приходится до 80 % элиминации цианида [17].

Роданаза и MST составляют два подсемейства ферментов сурмургтрансферазы. Роданаза локализуется в митохондриальной матрице, тогда как MST является как цитозольным, так и митохондриальным ферментом. Эти ферменты используют или продуцируют сульфоновую серу – двухвалентную серу, связанную с другой серой, и существующую в виде органических полисульфинов ($R^1\text{-S-S}_x\text{-S-R}^2$), органических персульфатов ($R^1\text{-SS-}$), тиосульфатов ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), органических тиосульфонов (RSO_2S^-), политионатов ($\text{O}_3\text{S-S}_x\text{-SO}_3^{2-}$) и элементарной серы в виде ступенчатого восьмичленного кольца.

Роданаза катализирует перенос серы на цианид или другие акцепторы серы (тиофилы). MST катализирует перенос серы из метилового углерода 3-меркаптопирувата на цианиды, тиолы, сульфиды и сульфиты. Транспортировка серы, катализируемая MST, включает разрушение связи углерод – сера, а не расщепление серо-серной (сульфановой) связи, как в случае роданазы. В результате оба фермента, как уже отмечалось, образуют тиоцианат в качестве продукта сульфатирования цианидов, используя при этом различные субстраты и механизмы катализа. Традиционно, роданаза рассматривается в качестве основного фермента, ответственного за детоксикацию цианида [18]. Однако MST и роданаза функционируют сообща в единой системе, в которой субстраты серы, вырабатываемые опосредованным MST катализом, передаются в реакционный пул роданазы с дальнейшим образованием тиоцианата [19].

Вторичным метаболическим путем биотрансформации цианида является не ферментативная реакция цианида с цистином (Cystine), с последующим замыканием кольца и образованием 2-аминотиазолин-4-карбоновой кислоты (2-aminothiazoline-4-carboxylic acid), ее таутомера 2-иминотиазолин-4-карбоновой кислоты (2-iminothiazoline-4-carboxylic acid) и элиминацией их через почки (рис.1). На этот метаболический путь приходится до 15 % доставляемой дозы цианида [20].

В метаболизме цианида участвуют также ферменты: цистатионаза- γ -лиаза (γ -цистатионаза) и тиосульфатредуктаза. Фермент γ -цистатионаза непосредственно не катализирует окисление цианида до SCN-, а продуцирует тиоцистин (бис-(2-амино-2-карбокситил) трисульфид) и тиоцистеин (3-(тиосульфено)-аланин. Тиоцистин в семь раз эффективнее тиосульфата в качестве сернистого субстрата в катализируемом роданазой транссульфировании цианида в SCN- [21]. Тиоцистеин транссульферирует гипотаурин (2-аминоэтансульфоновую кислоту) до тиотаурина (2-аминоэтантисульфоната) [22]. Тиосульфатредуктаза (сульфатредуктаза) участвует в цианидной сульфурации путем неферментативного переноса серы на цианид.

При определенных условиях альбумин может функционировать как сурмургидотрансфераза. Сульфеновая сера, содержащая альбумин, легко подвергаться нуклеофильной атаке цианидом с образованием SCN- [23]. 1991).

Являясь сильным нуклеофилом, цианид реагирует с карбонильными группами (*carbon compounds*) альдегидов и кетонов с образованием циангидринов (рис. 1) [24]. Образование циангидринов служит основой антагонизма цианида с α -кетокислотами [25].

Детоксикация цианидов посредством образования нетоксичных роданистых соединений. При острой цианидной интоксикации одним из направлений антидотной

терапии, как уже отмечалось, является введение донора серы для ускорения биотрансформации цианида до тиоцианата (SCN). Ферментативная конверсия цианида в тиоцианат (SCN), катализируется роданазой либо 3-меркаптопируватсульфотрансферазой (3-MPST). Оба фермента образуют тиоцианат в качестве продукта сульфатирования цианидов, используя при этом различные субстраты и механизмы катализа.

Введение экзогенных субстратов серы, таких как традиционный антидот цианидов тиосульфат натрия, увеличивает пул субстратов для облегчения опосредованной роданазой реакции. Учитывая побочные токсичные реакции тиосульфата натрия, в качестве потенциальных антидотов цианидов рассматриваются доноры серы, альтернативные тиосульфату натрия.

Учитывая различное тканевое и субклеточное распределение роданазы и MPST было высказано предположение, что пополнение пула и активизация MPST – опосредованного пути детоксикации цианида - может рассматриваться в качестве перспективного направления поиска антидотов цианидов [26]. В целях поиска более эффективных и безопасных антидотов цианидов были синтезированы и испытаны различные производные сульфоновой серы в качестве альтернативного тиосульфату натрия донатора серы [27]. Попытки использования эндогенного субстрата (3-меркаптопирувата) в качестве антидота цианидов не увенчались успехом из-за его химической нестабильности. Для увеличения периода его полувыведения была синтезирована серия пролекарств, которые освобождают 3-меркаптопируват.

Определенный прогресс был достигнут при скрининге на антицианидную активность *3-Mercaptopyruvatedithiane (Sulfangen sodium)*. При профилактическом (за 30 мин до затравки) внутрибрюшинном введении препарата индекс защиты (ИЗ) составлял 3,8–4,3; при терапевтическом (через 5 мин после воздействия цианидов) введении ИЗ = 4 [28].

Сульфанген (Sulfangen sodium) спонтанно диссоциирует с катаболитом цистеина 3-меркаптопируватом. Последний является субстратом 3-MPST, который катализирует высвобождение сульфона (синглетной серы) из 3-меркаптопирувата. Взаимодействие цианиона с сульфеном приводит к образованию тиоцианата (рис. 2).

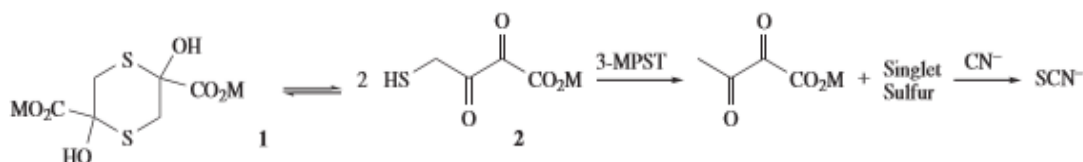


Рисунок 2 – 3-MPST опосредованный метаболизм цианида: сульфанген (соединение 1); 3-меркаптопируват (соединение 2) с последующей реакцией

Сульфанген оказался эффективным противоядием цианида в экспериментальных моделях (внутривенное введение в опытах на мышах, кроликах, свиньях) острого отравления цианидами [29-30]. Водорастворимые соли сульфангена были получены в ряду эквипотентных сульфангену натрия солей триэтаноламмония, диэтаноламмония, глюкозаммония, N, N-диметилэтанолламмония, N-метилэтанолламмония и холина. Сравнительные исследования солей сульфангена, включая растворимость, токсичность и эффективность, проводятся для выбора оптимального кандидата для коммерческого развития данного направления поиска антидотов цианидов. Вероятно, что новые высокоэффективные антидоты цианидов могут быть разработаны с использованием конструкции пролекарства субстрата 3-MPST.

В качестве другого направления поиска безопасных и эффективных антидотов цианидов рассматривалась возможность использования экзогенно вводимой роданазы. Так как родоназа локализуется в матрице митохондрий, неорганические ионизированные доноры серы, такие как тиосульфат натрия, имеют ограниченную доступность к ферменту. Чтобы преодолеть это фармакокинетическое ограничение, кристаллизованную роданазу вводили непосредственно в кровоток. В более ранних исследованиях было показано, что одновременное введение тиосульфата натрия и очищенной бычьей родозы значительно уменьшало летальность цианида, однако продолжительность защитного действия была короткой, что ограничивало возможность использования данного подхода [31].

Для увеличения продолжительности действия экзогенно вводимой роданазы предпринимались попытки инкапсулирования бычьей роданазы в эритроциты, а также использование бутантиосульфоната в качестве альтернативного донора серы, который вводили после внутривенной инъекции инкапсулированной бычьей роданазы [18, 32].

Потенциальные ограничения этого подхода для практической реализации использования роданазы в качестве антидота связаны с возможным развитием аллергических реакций, которые могут быть преодолены с помощью рекомбинантной человеческой

роданазы. Сообщалось и об использовании липосомных везикул, инкапсулирующих роданазу в виде цианидного антидота [33].

В метаболизме цианида участвуют также фермент цистатионаза- γ -лиаза (γ -цистатионаза), продуцирующая *тиоцистин* (бис-(2-амино-2-карбоксиэтил)трисульфид) и тиоцистеин (3-(тиосульфено)-аланин (рис.1). Тиоцистин оказался в семь раз эффективнее тиосульфата в качестве сернистого субстрата в катализируемом роданазой транссульфировании цианида в SCN^- [21]. Не исключается возможность использования этого эндогенного механизма детоксикации при поиске потенциальных антидотов цианидов.

В качестве одного из перспективных направлений рассматривалась разработка антидотов на основе дисульфидов как донаторов серы (вещества под кодом *ICD*). В экспериментах на животных по меньшей мере два донатора серы в выбранных дозах обеспечивали 100%-ю защиту от $2DL_{50}$ NaCN: препараты *ICD2214* (2-аминоэтил 4-метоксифенил дисульфид гидрохлорид) и *ICD2467* (бис 4 метоксифенил дисульфид). Данные соединения вводили внутривенно за 15 мин до введения цианида натрия [34].

Детоксикация цианидов посредством образования нетоксичных цианкобаламинов. Циан-ион представляет собой амбидентатный лиганд, который связывается с комплексообразователем через разные атомы, входящие в его состав. Он легко образует комплексы с переходными тяжелыми металлами в биологических системах (в частности, с кобальтом в белковых комплексах). Образование металлоцианидных комплексов лежит в основе антидотного действия гидроксокобаламина и потенциального антидота цианидов - кобинамида [35].

Кобинамид (Cobinamide) - предпоследнее соединение в цепи биосинтеза кобаламина (витамина B_{12}). Он отличается от кобаламина отсутствием рибонуклеотидной группы диметилбензимидазола, привязанной к пуриновому кольцу и скоординированной с нижним осевым положением атома кобальта (рис. 3).

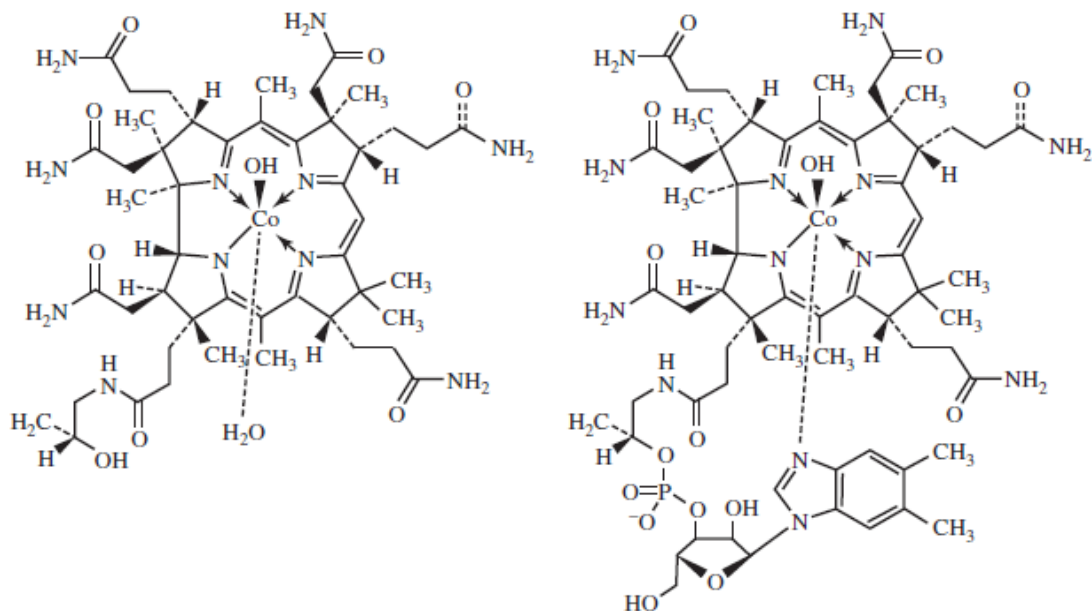


Рисунок 3 – Структура кобинамида (слева) и кобаламина (справа)

Особенности его химического строения (по сравнению с кобаламином) позволили предполагать наличие у него более выраженной антицианидной активности. Во-первых, оба сайта связывания верхнего и нижнего лигандов кобинамида являются свободными, тогда как кобаламин имеет только сайт связывания с верхним лигандом. Следовательно, кобинамид может связывать два цианидных иона (тогда как кобаламин связывает только один), тем самым создавая равноэффективный защитный эффект при введении в меньших дозах. Во-вторых, группа диметилбензимидазола имеет отрицательный трансэффект на верхнем связующем сайте кобаламина, вытягивая кобальт из плоскости пуринового кольца, тем самым уменьшая аффинность кобаламина к лигандам. В результате кобаламин связывает цианид с константой ассоциации (КА) 10^{12} M^{-1} . В то же время кобинамид связывает первый циан-ион с $\text{КА} > 10^{14} \text{ M}^{-1}$, второй — с $\text{КА} 10^8 \text{ M}^{-1}$ (суммарный $\text{КА} > 10^{22} \text{ M}^{-2}$). Последнее значение представляет собой достаточно высокую константу ассоциации, свойственную хелатирующим агентам [36]. В-третьих, кобинамид является менее водорастворимым, чем кобаламин, что позволяет использовать более концентрированные растворы первого по сравнению с последним. При растворении в воде гидроксил и молекула воды связываются с кобальтом кобинамида, в результате получается гидроксокобинамид.

Антицианидная эффективность кобинамида исследовалась на альтернативных биологических моделях, в опытах на мышах, крысах и кроликах. В клеточных культурах фибробластов легких хомячка китайского, обработанных цианидом, кобинамид более эффективно восстанавливал клеточную респираторную активность и полностью инвертировал цианид-индуцированное ингибирование роста клеток по сравнению с гидроксокобаламином. В опытах на *Drosophila melanogaster* кобинамид также проявлял более выраженную антицианидную активность, чем гидроксокобаламин. [37]. Кобинамид показал высокую защитную эффективность (превышающую эффективность гидроксокобаламина или комбинации тиосульфата натрия и нитрита натрия) при внутривенном и ингаляционном введении мышам, крысам и кроликам. При этом ингаляционный и/или внутрикостный путь введения обеспечивал быструю (сопоставимую с внутривенной инъекцией) доставку эффективных доз препарата в системную циркуляцию [38-39].

Прогнозируемая эффективная и безопасная доза кобинамида для человека, рассчитанная на основании полученных в эксперименте данных, составляет 10–15 мг/кг.

Детоксикация цианидов посредством образования нетоксичных циангидринов. К перспективному направлению создания принципиально нового малотоксичного лечебно-профилактического антидота цианидов относятся исследовательские работы с производными 2-оксокарбоновых кислот, образующих с цианидами малотоксичные циангидрины. В 1997 г. в качестве антидота цианидов в США была запатентована 2-оксопропандиоловая кислота [40]. Дальнейшего продолжения работ с этим препаратом не последовало, что, вероятно, связано с недостаточной стабильностью 2-оксопропандиоловой кислоты.

В одном из первых сообщений, касающихся экспериментальной оценки возможности использования α -кетоглутаровой кислоты (А-KG) в качестве антидота цианидов, констатировалось, что препарат, как в изолированном виде, так и в комбинации с тиосульфатом натрия, обладает статистически достоверным терапевтическим эффектом [41]. Достаточно высокая антицианидная активность, связывающей циан-ионы в сосудистом русле была подтверждена экспериментально [42]. В дальнейшем было показано что среди 13 исследованных карбонильных соединений самой высокой антицианидной токсичностью обладала кетоглутаровая кислота, являющаяся одним из основных промежуточных продуктов процесса обмена белков, жиров, углеводов, и играющая ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза [43].

Первые экспериментальные данные, свидетельствующие о высокой антидотной активности (А-KG) при цианидной интоксикации в опытах на мышах были предоставлены S. J. Moore, et al., (1986) [25]. В дальнейшем антидотная эффективность А-KG была подтверждена в экспериментах на собаках [44]. Было показано, что защитный индекс потенциального антидота составлял 5, а при совместном введении тиосульфата натрия достигал 100. Установлено также, что А-KG при профилактическом пероральном введении крысам защищает от отравления ацетонитрилом, акрилонитрилом, малонитрилом, пропионитрилом и нитропруссидом натрия [45].

Исследования, проведенные на грызунах, показали, что предварительное (за 10 мин) введение А-KG (0,125–2,0 г/кг) увеличивало значения DL_{50} цианида в 7-7,6 раз; 60-минутная предварительная обработка А-KG также обеспечивала высокую антицианидную защиту [46]. Результаты экспериментов показали, что антицианидная активность А-KG превышает таковую диметиламинофенола, дикобальта ЭДТА и тиосульфата натрия и сопоставима с активностью гидроксокобаламина [47].

Цианид, являясь высокореактивным нуклеофилом, связывает CN-ионы в сосудистом русле с образованием нетоксичного комплекса циангидрина, снижая их поступление к тканям-мишеням, что в свою очередь уменьшает тканевую гипоксию [42,44]. В ряде работ

обращается внимание на цитопротекторные эффекты А-KG, оцениваемые по цианид-индуцированной цитотоксичности на изолированных клеточных культурах [43, 48-49]. При сочетанном применении А-KG с N-ацетилцистеином удается избежать цитотоксичности и окислительного стресса, инициируемых цианидом [50-51].

К разработанным лекарственным формам антидотов на основе альфа-кетоглутарата (А-KG) относятся: 12,5%-й раствор альфа-кетоглутарата для внутривенного введения (при отравлении цианидами и продуктами горения); 3%-й раствор альфа-кетоглутарата для ингаляции с помощью специального распылителя (предназначен для нейтрализации цианида в случаях химического терроризма, попытках самоубийства, отравлениях на пожарах); глазные капли 1%-й раствор альфа-кетоглутарата для интраконъюнктивального введения (для нейтрализации цианидов при попадании в глаза).

Разработка пероральных лечебно-профилактических антидотов цианидов. На первых этапах разработка перорального лечебно-профилактического антидота цианидов проводилась на основе принципа *MtHb*-образования при скрининге соединений ряда аминокинолинов, аминокфенонов и пара-аминокфенона [52-53]. На основе 8-аминокинолина был получен препарат WR 242511, в экспериментах на животных обеспечивавший защиту от воздействия 2DL₅₀ синильной кислоты [52]. В Великобритании «раствор А & В» (сульфат железа, растворенный в водной лимонной кислоте, и водный карбонат натрия) рассматривался в качестве потенциального перорального антидота цианидов [54].

В 1991 г. M. D. Dulaney, et al. [55] было высказано предположение об эффективности перорального применения А-KG при острых отравлениях цианидами. Экспериментально-теоретическое обоснование возможности использования А-KG как перорального антидота цианидов было дано R. Bhattacharya (2002) [56]. В дальнейших исследованиях при экспериментальной (в опытах на крысах) оценке антидотной активности 14 карбонильных соединений и их метаболитов в отношении цианогенов (ацетонитрила, акрилонитрила, малонитрила, пропониитрила, нитропрусида натрия, калия феррицианида) было показано, что наиболее эффективным препаратом оказался А-KG при его пероральном введении. Максимальный индекс защиты (ИЗ = 5,6) отмечался на фоне отравления малонитрилом и пропониитрилом [57].

R. K. Tulsawani, et al. (2007) продемонстрировал высокую антицианидную активность А-KG при пероральном введении и предложил использовать его в качестве потенциального профилактического антидота при чрезвычайных ситуациях, сопровождающихся выбросом цианидов в окружающую среду [58].

По данным доклинических исследований эффективная доза А-KG составила 2,0 г/кг; в исследованиях на добровольцах показано, что эта доза может быть уменьшена до 150 мг/кг массы тела при поддержке достаточной гидратации [59]. DL₅₀ А-KG при пероральном введении у крыс составляет > 5, 0 г/кг. В дозах 2,0 и 4,0 г/кг гематологических, биохимических, физиологических и гистологических изменений в организме экспериментальных животных не отмечается. Исследование подострой токсичности при повторном пероральном введении животным эффективных доз А-KG также не выявило клинических отклонений [60-61]. Период полувыведения и C_{max} А-KG составляют соответственно 0,53 ч и 36,9 мкг/мл после перорального введения крысам 2,0 г/кг препарата. Через 60 мин после введения концентрация А-KG в крови снижалась до 16,01 мкг/мл. G. Mittal, et al. (2010) показано, что биологическая доступность А-KG значительно улучшалась при последующей гидратации [59, 62]. Результаты клинических испытаний безопасности и исследование фармакокинетики на добровольцах показали возможность развития тошноты, рвоты и легкой тахикардии после перорального введения 20 г А-KG [59].

В настоящее время в Индии в качестве перорального профилактического антидота при отравлениях цианидами принят А-KG в виде водного раствора (бутыли емкостью 100 мл при сроке годности водного раствора 2 года) и сухого порошка (порошок, срок хранения 5 лет).

Таким образом, экспериментальные и клинические данные свидетельствуют, что пероральная профилактика и терапия А-KG может рассматриваться в качестве альтернативы амилнитриту в случае групповых и массовых отравлений цианидами.

Как уже отмечалось, одним из основных путей превращения цианидов в организме является взаимодействие с органическими соединениями серы с образованием роданистых соединений. Исследовались предшественники 3-меркаптопирувата - субстраты действия фермента 3-меркаптопируватсульфотрансферазы (3-MPST), обладающие способностью превращать цианиды в нетоксичные тиоцианаты как при парентеральном, так и при пероральном введении.

Н. Т. Nagasawa, et al. (2007) описан синтез производных 3-меркаптопировиноградной кислоты взаимодействием пировиноградной кислоты с сернистым натрием. Новые соединения при пероральном введении за 30 мин до воздействия цианида характеризовались индексом защиты на уровне 3,8–4,3. При внутрибрюшинном способе введения через 5 мин после введения цианида ЗИ составлял ≈ 4 [28]. В этой работе впервые удалось сочетать в одном соединении 2 механизма антицианидной активности: наличие «скрытой» кетокислоты

и серосодержащего соединения. Однако предложенные соединения оказались малоустойчивы на воздухе.

В развитие данного направления исследований в 2015 г. запатентованы способы получения смешанных кобальт(II)овых солей кетокарбоновых и меркаптокарбоновых кислот и их применения в качестве антидотов цианидов [63]. В данной работе предложены соединения, в молекуле которых содержатся элементы, независимо друг от друга обладающие способностью превращать цианиды в менее токсичные производные (тиолы, кетокарбоновые кислоты и соли кобальта). Синтезированные соединения эффективны и малотоксичны при пероральном способе введения, сочетаемы с известными метгемоглобинообразователями.

С целью разработки лекарственной пероральной формы лечебно-профилактического антидота цианидов, сочетающей в своей молекуле различные механизмы антицианидного действия, были получены соединения, в молекуле которых содержались одновременно активированная α -кетокислота, меркаптоуксусная кислота, а в качестве солеобразующего металла - переходный металл, способный к комплексообразованию (кобальт).

В результате проведенной доклинической оценки эффективности *смешанной кобальтовой (2^+) соли меркаптоуксусной и пировиноградной кислот* показано, что при одновременном введении смертельных доз цианида натрия и потенциального антидота отмечалось купирование ведущих симптомов интоксикации на 75–100 % и предотвращение гибели животных (ИЗ и АМ при внутрижелудочном введении составляли 1,40 и 1,08 соответственно). Профилактическое (за 30 мин) введение $\sim 1,8$ раз увеличивало эти показатели: ИЗ=2,5; АМ=1,9. При этом продолжительность защитного действия сохранялось в течение 30–60 минут. Исследование фармакокинетики пероральной лекарственной формы потенциального лечебно-профилактического антидота на основе *смешанной кобальтовой (2^+) соли меркаптоуксусной и пировиноградной кислот* показало, что наибольшая концентрация кобальта в плазме крови кролика фиксируется через 1,7 ч после введения препарата и составляет $67,91 \pm 4,69$ мкг/мл; последующее снижение концентрации кобальта характеризуется временем половинного убывания, равного $11,09 \pm 0,38$ ч; общее среднее время присутствия кобальта в организме составляет $14,39 \pm 0,32$ ч; объем распределения - 14 л/кг. Модельный образец потенциального антидота цианидов по параметрам острой токсичности относится к IV классу малотоксичных лекарственных веществ, обладает слабо выраженным кумулятивным эффектом (коэффициент кумуляции 1,2), в условиях подострого эксперимента не оказывает влияния на общее состояние, поведение животных, не оказывает

негативного влияния на биохимические параметры крови, основные физиологические функции организма [64-65].

Применительно к терапии отравлений цианидами, как к токсичным компонентам продуктов горения, в литературе неоднократно подчеркивалось о приоритетности использования кобальтсодержащих соединений. В этой связи на примере кобальтового комплекса с аргинином экспериментально показана принципиальная возможность создания малотоксичного перорального комбинированного антидота цианида и монооксида углерода на основе металлокомплексных соединений с псевдопептидными лигандами [66-67].

Список литературы

1. Marrs T.C. The choice of cyanide antidotes. *Clinical and Experimental Toxicology of Cyanides*. 1987; 383-401.
2. Gunasekar P.G., Borowitz J.L., Turek J.J., et al. Endogenous generation of cyanide in neuronal tissue: Involvement of a peroxidase system. *J. Neurosci. Res.* 2000; 61: 570-575.
3. Cipollone R., Visca P. Is there evidence that cyanide can act as a neuromodulator? *IUBMB Life*. 2007; 59: 187-189.
4. Chen K.K., Rose C.L. Nitrite and thiosulfate therapy in cyanide poisoning. *J. Am. Med. Assoc.* 1952; 149 (2): 113-119.
5. Chen K., Rose C., Clowes G. Comparative values of several antidotes in cyanide poisoning. *Amer. J. Med. Sci.* 1934; 188: 767-781.
6. Hall A.H., Saiers J., Baud F. Which cyanide antidote? *Crit. Rev. Toxicol.* 2009; 39: 541-552.
7. Zilker T. Medical management of incidents with chemical warfare agents. *Toxicology*. 2005; 214: 221-231.
8. Baselt R.C. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 11th edn. - Seal Beach, CA: Biomedical Publications, 2011.
9. Pluta R.M., Oldfield E.H., Bakhtian K.D., et al. Safety and feasibility of long-term intravenous sodium nitrite infusion in healthy volunteers. *PLoS One*. 2011; 6(1): 14504.
10. Зверев М.И. Отравление цианидами. - М.: Медицина, 1983.
11. Paulet G., Le Bars R. Resuscitation after death by cyanide poisoning (study in the dog). *J. Physiologie*. 1959; 51: 547-548.
12. Mushett C.W., Kelley K.L., Boxer G.E., et al. Antidotal efficacy of vitamin B_{12a}

(hydroxo-cobalamin) in experimental cyanide poisoning. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1952; 81: 234-237.

13. *Marrs T.C.* Dicobalt edetate (Kelocyanor) van Heijst (eds.) IPCS/CEC Evaluation of Antidotes Series. Vol. 2: Antidotes for Poisoning by Cyanide. -Cambridge: Cambridge University Press, 1993.

14. Baud F. Cyanide: critical issues in diagnosis and treatment. *Human Exp. Toxicol.* 2007; 26: 191-201.

15. Isom G.E., Borowitz J.L., Mukhdpadhyay S. Enzymes involved in cyanide metabolism. *Comprehensive Toxicology*. Vol. 3: Biotransformation, 2nd edn. - Oxford: Elsevier Science, 2010.

16. Johnson J.D., Conroy W.G., Isom G.E. Alteration of cytosolic calcium levels in PC12 cells by potassium cyanide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1987; 88: 217-224.

17. Aminlari M., Malekhussein A., Akrami F., Ebrahimnejad A. Cyanide-metabolizing enzyme rhodanese in human tissues: Comparison with domestic animals. *Comp. Clin. Pathol.* 2007; 16: 47-51.

18. Way J.L, Cannon E., Leung P., et al. Antagonism of cyanide intoxication with rhodanese encapsulated resealed erythrocytes. *Adv. Biosci.* 1991; 81: 207-211.

19. Wing D.A., Patel H.C., Baskin S.I. The effect of picrylsulfonic acid on in vitro conversion of cyanide to thiocyanate by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and rhodanese. *Toxicol. in Vitro.* 1992; 6: 597–603.

20. Borowitz J.L., Kanthasamy A., Isom G.E. Toxicodynamics of Cyanide // *Chemical Warfare Agents*. San Diego: Academic Press, 1992.

21. Szczepkowski T.W., Wood J.L. The cystathionase rhodanese system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1967; 139: 469-478.

22. Cavallini D., DeMarco C., Mondovi B. The cleavage of cystine by cystathionase and the transulfuration of hypotaurine. *Enzymologia.* 1960; 22: 161-165.

23. Jarabak R., Westley J. Localization of the sulfur-cyanolysis site of serum albumin to subdomain 3-AB. *J. Biochem. Toxicol.* 1991; 6: 65-70.

24. Dzombak D.A., Ghosh R.S., Young T.C. Physical-chemical properties and reactivity of cyanide in water and soil. *Cyanide in Water and Soil*. New York: Taylor & Francis, 2006.

25. Moore S.J., Norris J.C., Ho I.K., Hume A.S. The efficacy of α -ketoglutaric acid in the antagonism of cyanide intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986; 82: 40-44.

26. Porter D.W., Baskin S.I. The effect of three α -keto acids on 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase activity. *Biochem. Molec. Toxicol.* 1996; 11: 45-50.

27. Isom G.E., Johnson J.D. Sulfur donors in cyanide intoxication. *Clinical and*

Experimental Toxicology of Cyanides. Bristol: Wright, 1987.

28. Nagasawa H.T., Goon D.J., Crankshaw D.L. Novel, orally effective cyanide antidotes. *J. Med. Chem.* 2007; 50 (26): 6462-6464.

29. Brenner M., Lim J.G., Lee J., et al. Sulfanegen sodium treatment in a rabbit model of sub-lethal cyanide toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2010; 248: 269-276.

30. Belani K.G., Singh H., Beebe D.S., et al. Cyanide toxicity in juvenile pigs and its reversal by a new prodrug, sulfanegen sodium. *Anesth. Analg.* 2012; 114(5): 956-961.

31. Clemenson C.J., Hultman H.I., Sörbo B. The antidote effect of some sulfur compounds and rhodanese in experimental cyanide poisoning. *Acta Physiol. Scand.* 1954; 32: 245-251.

32. Petrikovics I., Cannon E.P., McGuinn W.D., et al. Cyanide antagonism with carrier erythrocytes and organic thiosulfonates. *Appl. Toxicol.* 1995; 24: 86-93.

33. Petrikovics I., Budal M., Baskin S.I., et al. Characterization of liposomal vesicles encapsulating rhodanese for cyanide antagonism. *Drug. Deliv.* 2009; 16: 312-319.

34. Baskin S.I., Porter D.W., Rockwood G.A., et al. In vitro and in vivo comparison of sulfur donors as antidotes to acute cyanide intoxication. *J. Appl. Toxicol.* 1999; 19(3): 173-182.

35. Chan A., Balasubramanian M., Blackledge W., et al. Cobinamide is superior to other treatments in a mouse model of cyanide poisoning. *Clin. Toxicol. (Phila)*. 2010; 48: 709-717.

36. Hayward G.C., Hill H.A., Pratt J.M., et al. The chemistry of vitamin B₁₂. Part IV: The thermodynamic trans effect. *J. Chem. Soc.* 1965; 12: 6485-6493.

37. Broderick K.E., Potluri P., Zhuang S., et al. Cyanide detoxification by the cobalamin precursor cobinamide. *Exp. Biol. Med.* 2006; 231: 641-649.

38. Brenner M., Kim J.G., Mahon S.B., et al. Intramuscular cobinamide sulfite in a rabbit model of sublethal cyanide toxicity. *Emerg. Med.* 2009; 55: 352-362.

39. Chan A., Crankshaw D.L., Monteil A., et al. The combination of cobinamide and sulfanegen is highly effective in mouse models of cyanide poisoning. *Clin. Toxicol. (Phila)*. 2011; 49: 366-373.

40. Патент США № 5674904, кл. 514/574. - Опублик. 07.10.1997.

41. Schwartz C., Morgan R.L., Way L.M. et al. Antagonism of cyanide intoxication with sodium pyruvate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1979; 50: 437-441.

42. Hume A.S., Moore S J., Hume A.T. Effects of alpha-ketoglutaric acid on the distribution of cyanide and acidosis associated with cyanide intoxication. *Toxicologist.* 1996; 3: 98.

43. Bhattacharya R., Tulsawani R.K. In vitro and in vivo evaluation of various carbonyl compounds against cyanide toxicity with particular reference to alpha-ketoglutaric acid. *Drug. Chem. Toxicol.* 2008; 31: 149-161.

44. Norris J.C., Utley W.A., Hume A.S. Mechanism of antagonising cyanide induced lethality by α -ketoglutarate acid. *Toxicology*. 1990; 9: 3-9.
45. Bhattacharya R., Satpute R.M., Hariharakrishnan J., et al. Acute toxicity of some synthetic cyanogens in rats and their response to oral treatment with alpha-ketoglutarate. *Food. Chem. Toxicol.* 2009; 47: 2314-2320.
46. Bhattacharya R., Lakshmana Rao P.V., Vijayaraghavan R. In vitro and in vivo attenuation of experimental cyanide poisoning by α -ketoglutarate. *Toxicol. Lett.* 2002; 128: 185-195.
47. Kravzov J., Ríos C, Altagracia M., Jiménez D. Comparison of cobalt edetate and alpha-ketoglutarate as antidotes against cyanide intoxication in mice. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1994; 37: 43-44.
48. Hariharakrishnan J., Satpute R.M., Bhattacharya R. Cyanide-induced changes in the levels of neurotransmitters in discrete brain regions of rats and their response to oral treatment with α -ketoglutarate. *Indian J. Exp. Biol.* 2010; 48: 731-736.
49. Hariharakrishnan J., Satpute R.M., Prasad G.B., Bhattacharya R. Oxidative stress mediated cytotoxicity of cyanide in LLC–MK2 cells and its attenuation by Alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine. *Toxicol. Lett.* 2009; 185: 132-141.
50. Satpute R.M., Hariharakrishnan J., Bhattacharya R. Effect of alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine on cyanide-induced oxidative stress mediated cell death in PC12 cells. *Toxicol. Ind. Health.* 2010; 26: 297-308.
51. Satpute R.M., Hariharakrishnan J., Lomash V., et al. Oxidative stress and tissue pathology caused by subacute exposure to ammonium acetate in rats and their response to treatments with alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine. *Toxicol. Ind. Health.* 2012.
52. Rockwood G.A., Duniho S.M., Briscoe C.M. Toxicity in rhesus monkeys following administration of the 8-aminoquinoline 8-[(4-amino-1-methylbutyl) amino]-5-(1-hexyloxy)-6-methoxy-4-methylquinoline (WR242511). *J. Med. Toxicol.* 2000; 4 (3): 157-166.
53. Marino M.T., Urquhart M.R., Sperry M.L. Pharmacokinetics and kinetic-dynamic modeling of aminophenones as methaemoglobin forms. *J. Pharm. Pharmacol.* 1997; 49(3): 282-287.
54. Nicholls P., Soulimane T. The mixed valence state of the oxidase binuclear centre: How thermophilus cytochrome Ba_3 differs from classical Aa_3 in the aerobic steady state and when inhibited by cyanide. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1655: 381-387.
55. Bhattacharya R., Vijayaraghavan R. Promising role of α -ketoglutarate in protecting the lethal effects of cyanide. *Hum. Exp. Toxicol.* 2002; 21: 297-303.

56. Dulaney M.D., Brumley M., Willis J.T., Hume S. Protection against cyanide toxicity by oral alpha-ketoglutaric acid. *Vet. Hum. Toxicol.* 1991; 33: 571-575.
57. Bhattacharya R., Niranjana L. Protective efficacy of various carbonyl compounds and their metabolites, and nutrients against acute toxicity of some cyanogens in rats: biochemical and physiological studies. *Interdisciplinary Toxicology* 2017; 10(1): 1–10.
58. Tulsawani R.K., Kumar D., Bhattacharya R. Effect of pretreatment of α -ketoglutarate on cyanide-induced toxicity and alterations in various physiological variables in rodents. *Biomed. Environ. Sci.* 2007; 20: 56–63.
59. Mittal G., Singh T., Kumar N., et al. Radiolabeling and dose fixation study of oral alpha-ketoglutarate as a cyanide antidote in healthy human volunteers. *Clin. Toxicol.* 2010; 48: 509-515.
60. Mathangi D.C., Shyamala R., Vijayshree R., et al. Effect of alpha-ketoglutarate on neurobehavioral, neurochemical and oxidative changes caused by sub-chronic cyanide poisoning in rats. *Neurochem. Res.* 2011; 36: 540-548.
61. Tulsawani R.K., Debnath M., Pant S.C., et al. Effect of sub-acute oral cyanide administration in rats: Protective efficacy of α -ketoglutarate and sodium thiosulfate. *Chem. Biol. Inter.* 2005; 156: 1-12.
62. Patra D. Serum kinetics study of α -ketoglutarate in Wistar rats following single oral administration. A project report. Jai Research Foundation, Valsad, India to DRDE, Gwalior.- Personal communication (Study No. 1573). 2005; 1: 27.
63. Патент RU2553275. Смешанные кобальт(II)овые соли кетокарбоновых и меркаптокарбоновых кислот или их гидраты или их сольваты, способ их получения и применение в качестве антидотов цианидов / В.Ю. Ковтун, Ю.А. Давидович, В.Д. Гладких и др.- Оpubл. 10.06.2015.
64. Баландин Н.В., Ковтун В.Ю., Гладких В.Д. и др. Доклиническая оценка инновационного лечебно-профилактического антидота цианидов на основе смешанной кобальтовой (II) соли меркаптоуксусной и пировиноградной кислот. *Современные проблемы науки и образования.* 2014; 3: 521.
65. Баландин Н.В., Ковтун В.Ю., Гладких В.Д. и др. К вопросу фармакокинетики лекарственной формы потенциального лечебно-профилактического антидота цианидов на основе смешанной кобальтовой (2 +) соли меркаптоуксусной и пировиноградной кислот. *Фундаментальные Исследования.* 2014; 9(5): 1023-1026.
66. Давидович Ю.А., Вершинина Г.В., Гладких В.Д. и др. Экспериментальная оценка возможности создания профилактического антидота монооксида углерода и цианидов на основе металлокомплексных соединений с псевдопептидными лигандами. *Медлайн.ру.* 2019;

20: 71-80.

67. Вершинина Г.В., Гладких В.Д., Баландин Н.В. и др. К вопросу разработки комбинированного антидота монооксида углерода и цианидов на основе дигидрата диацетата кобальтового (II) комплекса N-меркаптоацетил –L –аргинина //Сборник статей по материалам XXV-ой международной научно-практической конференции «Наука России: Цели и задачи». 2021; Ч.1.:16-19.