



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
GRIGORE T. POPA IAȘI

EVALUAREA EXPERIMENTALĂ A EFECTELOR ADVERSE ALE UNOR MEDICAMENTE ADMINISTRATE SUB FORMĂ MICROÎNCAPSULATĂ

Rezumatul tezei de doctorat

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. DR. Carmen Lăcrămioara ZAMFIR

DOCTORAND
Ionuț DRAGOSTIN

2019



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
GRIGORE T. POPA IAȘI

EVALUAREA EXPERIMENTALĂ A EFECTELOR ADVERSE ALE UNOR MEDICAMENTE ADMINISTRATE SUB FORMĂ MICROÎNCAPSULATĂ

Rezumatul tezei de doctorat

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. DR. Carmen Lăcrămioara ZAMFIR

DOCTORAND
Ionuț DRAGOSTIN

2019

Cuvinte cheie: *tuberculoză, hepatotoxicitate, izoniazidă, microparticule, biocompatibilitate*

Teza de doctorat cuprinde:

- 142 pagini- din care 40 pagini Partea generală;
- 54 Figuri – din care 52 în Partea personală;
- 19 Tabele – din care 11 în Partea personală;
- 338 referințe bibliografice.

În prezentul rezumat, cuprinsul, numerotarea figurilor selectate și lista de abrevieri sunt păstrate sub aceeași formă ca în teza de doctorat.

CUPRINS

ABREVIERI	iii
PARTEA GENERALĂ	1
CAPITOLUL 1	1
Reacții adverse produse de medicamente. Hipersensibilitatea medicamentoasă	1
1.1. Medicamente implicate în inducerea reacțiilor de hipersensibilitate	3
1.2. Eficacitatea antihistaminicelor H ₁ în alergiile produse de medicamente	13
CAPITOLUL 2	15
Reacții adverse produse de medicamente: nefrotoxicitatea și hepatotoxicitatea medicamentoasă	15
2.1. Medicamente implicate în inducerea reacțiilor de nefrotoxicitate	15
2.2. Medicamente implicate în inducerea reacțiilor de hepatotoxicitate	19
2.2.1. Forme clinice de afectare hepatică	20
2.2.2. Hepatotoxicitatea indusă de tuberculostatice	24
2.2.2.1. Tuberculoza. Aspecte generale	25
2.2.2.2. Tuberculoza în lume și în România	26
2.2.2.3. Profilul pacientului cu tuberculoză pulmonară	28
2.2.2.4. Tratamentul igienico-dietetic în TBC	30
2.2.2.5. Medicamente tuberculostatice	32
2.2.2.6. Toxicitatea medicației tuberculostatice	32
2.2.2.6.1. Toxicitatea hepatică a izoniazidei	32
2.2.2.6.2. Toxicitatea hepatică în diferite asocieri anti-TBC	33
2.2.2.6.3. Factorii de risc pentru hepatotoxicitatea indusă de medicamentele anti-TBC	34
CAPITOLUL 3	36
Polimeri utilizați pentru aplicații biomedicale	36
3.1. Biopolimeri. Aspecte generale	36
3.2. Chitosanul și utilizarea sa în obținerea microparticulelor ca sisteme de eliberare inteligentă a medicamentelor	36
3.3. Alte aplicații biomedicale ale microîncapsulării	38
PARTEA PERSONALĂ	41
CAPITOLUL 4	41
Motivația și obiectivele cercetărilor personale	41
CAPITOLUL 5	43
MATERIALE ȘI METODE	43
5.1. Evaluarea biologică și a profilului farmacotoxicologic în cazul izoniazidei și derivaților săi, administrați în suspensie și în formă microîncapsulată	43
5.1.1. Evaluarea acțiunii antimicrobiene <in vitro>	44
5.1.1.1. Metoda concentrațiilor absolute	45
5.1.1.2. Determinarea Concentrațiilor Minime Inhibitorii (CMI)	45
5.1.1.3. Determinarea Diametrului Zonei de Inhibiție	46
5.1.2. Efectuarea screeningului toxicologic. Determinarea toxicității acute și cronice	47
5.1.3. Efectuarea studiului histopatologic	49
5.1.4. Evaluarea biocompatibilității in vitro a probelor utilizând analiza viabilității celulelor MTT	51
5.1.5. Evaluarea parametrilor biochimici	52
5.1.5.1. Alaninaminotransferaza (ALAT)/ Transaminaza Glutamic-Piruvică (TGP)	53
5.1.5.2. Aspartataminotransferaza (ASAT)/ Transaminaza Glutamic-Oxalacetică (TGO)	54
5.1.5.3. Fosfataza alcalină	55

5.1.5.4. Colesterolul total	56
5.1.5.5. Albumina serică	57
5.1.5.6. Metode statistice pentru evaluarea parametrilor biochimici	57
CAPITOLUL 6	58
REZULTATE	58
6.1. Evaluarea biologică și a profilului farmacotoxicologic în cazul izoniazidei și a derivaților săi, administrați în suspensie	58
6.1.1. Evaluarea acțiunii antimicrobiene <in vitro>	58
6.1.1.1. Metoda concentrațiilor absolute	58
6.1.1.2. Determinarea Concentrațiilor Minime Inhibitorii (CMI)	59
6.1.1.3. Determinarea Diametrului Zonei de Inhibiție	59
6.1.2. Efectuarea screeningului toxicologic. Determinarea toxicității acute.	61
6.1.3. Determinarea toxicității cronice. Efectuarea studiului histopatologic	63
6.1.4. Evaluarea biocompatibilității in vitro a probelor utilizând analiza viabilității celulelor MTT	68
6.1.5. Evaluarea parametrilor biochimici	70
6.1.5.1. Alaninaminotransferaza (ALAT)/ Transaminaza Glutamic-Piruvică (TGP)	70
6.1.5.2. Aspartataminotransferaza (ASAT)/ Transaminaza Glutamic-Oxalacetică (TGO)	72
6.1.5.3. Fosfataza alcalină	73
6.1.5.4. Colesterolul total	74
6.1.5.5. Albumina serică	75
6.2. Evaluarea profilului farmacotoxicologic al izoniazidei și derivaților săi, administrați în formă microîncapsulată	76
6.2.1. Determinarea toxicității cronice. Efectuarea studiului histopatologic	76
6.2.2. Evaluarea biocompatibilității in vitro a probelor utilizând analiza viabilității celulelor MTT	80
6.2.3. Evaluarea parametrilor biochimici	82
6.2.3.1. Alaninaminotransferaza (ALAT)/ Transaminaza Glutamic-Piruvică (TGP)	83
6.2.3.2. Aspartataminotransferaza (ASAT)/ Transaminaza Glutamic-Oxalacetică (TGO)	84
6.2.3.3. Fosfataza alcalină	85
6.2.3.4. Colesterolul total	86
6.2.3.5. Albumina serică	87
6.2.4. Studiu comparativ al parametrilor biochimici pe toate cele 11 loturi de animale (pentru substanțe neîncapsulate și încapsulate)	89
6.2.5. Corelația markerilor hepatici la animalele de laborator tratate cu izoniazidă și derivați neîncapsulați	98
6.2.6. Corelația markerilor hepatici la animalele de laborator tratate cu izoniazidă și derivați încapsulați în chitosan	100
CAPITOLUL 7	103
DISCUȚII	103
CAPITOLUL 8	123
CONCLUZII	123
CAPITOLUL 9	125
Elemente de noutate și perspective de viitor pe care le deschide teza de doctorat	125
Referințe bibliografice	127

ABREVIERI UTILIZATE

ADN	Acidul dezoxiribonucleic
ALAT	Alaninaminotransferaza
APC	eng. antigen presenting cell
ARN	Acidul ribonucleic
ASAT	Aspartataminotransferaza
ATP	Acidul adenozintrifosforic
BPOC	Bronhopneumopatie obstructivă cronică
CLMW	eng. Chitosan low molecular weight
CMC-Na	Carboximetilceluloză sodică
CMI	Concentrația minimă inhibitorie
CMMW	eng. Chitosan medium molecular weight
COX	Ciclooxigenaza
DL 50	Doza letală 50
DMSO	Dimetilsulfoxid
DPPH	1,1-difenil-picril-hidrazil
DTG	eng. Differential thermogravimetric analysis
FT-IR	eng. Fourier transform infrared spectroscopy
GFR	Rată de filtrare glomerulară
GST	Glutathion S-transferaza
HGF	Factor de creștere hepatocitară
HIN	Hidrazida acidului izonicotinic
IECA	Inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei
Ig	Imunoglobuline
IL-6	Interleukina-6
IMC	Indice de masă corporală
Ly	Limfocite
MEM	Mediul minim esențial
MHC	Complexul major de histocompatibilitate
MSR	eng. Membrane Swelling Ratio
mtFAO	eng. mitochondrial Fatty Acid Oxidation
NAT	N-acetiltransferaza
NGF	Factorul de creștere a nervilor
OD	Densitatea optică
OMS	Organizația Mondială a Sănătății
PAF	Factorul de agregare plachetară
PAS	Acid para-aminosalicilic
PEG	Polietilenglicol
PG	Prostaglandine
PNCT	Programul Național de Control al Tuberculozei
PZA	Pirazinamida
RAM	Reacțiile adverse produse de medicamente
RIF	Rifampicina
ROS	Specii reactive de oxigen
TBC	Tuberculoza
TG	eng. Thermogravimetric analysis
TGF	Factor de creștere transformat
TGO	Transaminaza glutamic-oxalacetică
TGP	Transaminaza glutamic-piruvică
TMP-SMX	Trimetoprim+sulfametoxazol
TNF- α	Factor de necroza tumorală

INTRODUCERE

Reacțiile adverse predictibile (Tip A) reprezintă aproximativ 80 % din totalul reacțiilor adverse iar cele nepredictibile (Tip B) afectează mai mult de 10 % din populația globală, în timp ce în cazul pacienților spitalizați procentul crește la mai mult de 20 %. Din categoria reacțiilor predictibile fac parte cele toxice (care apar la supradoze), efectele adverse, efectele secundare, interacțiunile medicamentoase, în timp ce în rândul celor nepredictibile sunt incluse: intoleranța, idiosincrazia, alergiile și hipersensibilitatea non-alergică (Thong B. Y-H., Tan T.C., 2011). Una dintre cele mai frecvente efecte adverse, în cazul administrării substanțelor chimice, respectiv a medicamentelor utilizate voluntar sau nu, în supradozaj, sau chiar administrate în doze terapeutice, este lezarea hepatocitelor, motiv pentru care în industria medicamentelor, compușii experimentali sunt evaluați înainte și în timpul studiilor clinice, pentru ca în continuare să fie aprobați numai compușii care se dovedesc a fi siguri pentru utilizare comercială.

Tuberculoza, una dintre cele mai vechi afecțiuni cu largă răspândire la nivel global, reprezintă un factor important de deces în întreaga lume. În momentul în care tratamentul este corespunzător, tuberculoza, provocată de tulpinile sensibile la medicamente, este vindecabilă în cele mai multe cazuri, în timp ce în lipsa tratamentului, aceasta poate deveni mortală. Astăzi, terapia tuberculozei cuprinde un spectru terapeutic foarte larg, a cărui administrare atrage după sine o serie de reacții adverse importante cum ar fi reacțiile toxice sau de hipersensibilitate. Acesta este unul dintre motivele pentru care introducerea în terapeutică a unor noi substanțe active în tratamentul tuberculozei, se conturează a fi drept un factor extrem de important în definirea evoluției terapiei actuale.

Din dorința de a aprofunda și dezvolta cele de mai sus, studiul de față vizează testarea reducerii reacțiilor adverse de tipul toxicității medicamentoase la nivel tisular, folosind metoda de microîncapsulare, prin diferite teste in vitro și in vivo. Printr-o abordare originală și interdisciplinară, prezentul studiu își propune parcurgerea următoarelor direcții de cercetare: (i) încapsularea izoniazidei și a unor noi derivați ai acesteia, folosind chitosanul ca și material de încapsulare, în vederea utilizării probelor obținute, la efectuarea testelor in vitro și in vivo prevăzute în cadrul acestei lucrări; (ii) determinarea prin teste in vivo a toxicității acute (DL 50) a derivaților de izoniazidă; (iii) stabilirea efectului microîncapsulării noilor derivați de izoniazidă, asupra toxicității cronice la nivel tisular; (iv) efectuarea studiilor in vitro privind screening-ul antimicrobian pe tulpini de *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, precum și (v) determinarea biocompatibilității in vitro a atât a formelor neîncapsulate cât și a celorla încapsulate, prin determinarea viabilității celulare.

PARTEA PERSONALĂ

Capitolul 5 MATERIALE ȘI METODE

5.1. Evaluarea biologică și a profilului farmacotoxicologic în cazul izoniazidei și derivaților săi, administrați în suspensie și în formă microîncapsulată

Noi compuși cu structură hidrazonică (HIN-a, HIN-b, HIN-c) au fost evaluați din punct de vedere biologic și farmacotoxicologic, urmărindu-se pe de o parte determinarea potențialului antimicrobian, folosind ca și tulpină de testat *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177, și pe de altă parte determinarea toxicității acute prin stabilirea DL 50, precum și determinarea toxicității cronice la nivel hepatic, folosind teste in vivo, prin administrarea acestora în suspensie, la șoareci albi, masculi, rasa Swiss. În plus, s-a determinat biocompatibilitatea in vitro, prin analiza viabilității celulelor MTT.

5.1.1. Evaluarea acțiunii antimicrobiene <in vitro>

5.1.1.1. Metoda concentrațiilor absolute

Studiul a fost realizat în colaborare cu Spitalul Clinic de Pneumoftiziologie, Laboratorul de Analize Medicale, Iași. Acest test a fost efectuat pentru izoniazida părinte (HIN) și cei trei derivați ai acesteia, cu structură de izonicotinoilhidrazonă (HIN-a, HIN-b și HIN-c), utilizând ca tulpină microbiană *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177. Scopul acestei determinări este de a verifica influența modificării chimice realizate pe structura izoniazidei, asupra potențialului antimicrobian. Astfel, au fost folosite diluții de 1, 2 și 4 μg/ ml în DMSO (dimetilsulfoxid): diluțiile de 1 și 2 μg/ ml pentru HIN (cunoscute din literatura de specialitate ca fiind cele active pentru acest compus- *Agalloco J. P., Carleton F.J., 2007*), în timp ce pentru derivații HIN-a, HIN-b și HIN-c, au fost testate toate cele trei diluții. Mediul de cultură folosit pentru această metodă a fost unul solid, pe bază de ouă, Lowenstein-Jensen.

5.1.1.2. Determinarea Concentrațiilor Minime Inhibitorii (CMI)

În plus față de metoda concentrațiilor absolute, pentru a evalua influența modificărilor chimice efectuate în structura izoniazidei asupra activității antimicobacteriene odată cu obținerea noilor compuși sintetizați, s-au determinat concentrațiile minime inhibitorii (CMI) active față de specia *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177. Acest parametru (CMI) constituie un factor deosebit de important în stabilirea dozelor și a căilor de administrare în cazul infecțiilor cauzate de bacilul Koch.

5.1.1.3. Determinarea Diametrului Zonei de Inhibiție

Activitatea antibacteriană și antifungică a noilor compuși a fost evaluată in vitro, utilizând metoda difuzimetrică în mediu agarizat, conform specificațiilor CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100, 2017; Clinical and Laboratory Standard Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. Second Edition, 2009).

5.1.2. Efectuarea screeningului toxicologic. Determinarea toxicității acute și cronice

Derivații de izoniazidă (HIN.a, HIN.b și HIN.c) obținuți și descriși anterior, au fost evaluați in vivo comparativ cu izoniazida (HIN), din punct de vedere toxicologic, determinându-se doza letală 50. Studiul s-a realizat în colaborare cu disciplina de Farmacologie, Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie “Grigore T. Popa” Iași.

Găzduirea, manipularea, administrarea compușilor testați în suspensie și în formă microîncapsulată, precum și sacrificarea animalelor, s-au realizat conform ghidurilor privind deontologia și etica studiului pe animale de laborator (Legea nr. 206/27 mai 2004, EU/2010/63 - CE86/609/EEC) precum și prin obținerea avizului Comisiei de Etică a Cercetării U.M.F. “Grigore T. Popa” Iași, eliberat în data de 17.04.2018.

Toxicitatea acută, respectiv determinarea dozei letale 50, constă în administrarea compușilor în concentrații aflate în progresie geometrică, pentru a calcula doza care ucide 50% dintre șoareci. Toxicitatea substanțelor farmaceutice variază în mod invers proporțional cu valorile dozelor letale 50 obținute. Astfel, cu cât valoarea DL 50 este mai mare, cu atât toxicitatea compușilor scade.

Toxicitatea cronică. Pe baza rezultatelor obținute în cadrul testului de toxicitate acută, s-a urmărit toxicitatea cronică a compușilor obținuți, prin administrarea acestora în doze de 1/10 din DL 50, prin gavaj oral.

5.1.3. Efectuarea studiului histopatologic

În cazul evaluării toxicității acute, au fost examinate fragmente de creier, cord, rinichi, pulmon și ficat. În scopul evaluării efectului administrării compușilor selectați sub formă de suspensie, asupra toxicității cronice tisulare, s-a realizat un studiu histopatologic pe fragmente de țesut hepatic, pentru identificarea eventualelor modificări morfologice. Pentru evaluarea experimentală a efectului microîncapsulării compușilor selectați, asupra toxicității cronice tisulare, s-a realizat un studiu histopatologic pe fragmente de țesut hepatic, în vederea identificării eventualelor modificări morfologice produse prin administrarea cronică a substanțelor încapsulate. Prima etapă a constat în includerea fragmentelor tisulare prelevate în parafină. Blocurile de parafină rezultate au fost secționate la microtom, la 2-3 microni grosime, secțiunile obținute fiind expuse pe lame, după care s-au colorat specific cu H&E. Pentru a observa dacă există alterări tisulare care să evidențieze impactul administrării substanțelor în suspensie de CMC-Na 1%, s-a efectuat examenul microscopic, utilizând un microscop Nikon Eclipse 50i.

5.1.4. Evaluarea biocompatibilității in vitro a probelor utilizând analiza viabilității celulelor MTT

Studiul a fost realizat în colaborare cu Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Științe Biologice, București. Pentru analiza biocompatibilității și examinarea morfologiei celulare a probelor a fost utilizată o linie stabilizată de fibroblaste de șoarece NCTC (929 clone), cultivate în baloane de cultură tisulară T-25 la o densitate de 4×10^4 celule/ml în Mediul Minim Esențial (MEM) (Sigma-Aldrich) suplimentat cu ser fetal bovin 10% (Biocrom) și antibiotice 1% (penicilină, streptomycină și neomicină achiziționate de la Sigma-Aldrich). Evaluarea citotoxicității probelor sub formă

microîncapsulată a fost efectuată prin expunerea celulelor cultivate direct la eșantioane, urmată de evaluarea viabilității celulelor MTT.

5.1.5. Evaluarea parametrilor biochimici

Integritatea structurală a ficatului este frecvent apreciată prin determinarea activității aminotransferazelor serice (TGP și TGO) (Amin A., Hamza A.A., 2005) astfel că în continuare, pentru investigarea afectării funcției hepatice în cazul administrării cronice a substanțelor microîncapsulate, au fost determinate nivelurile serice ale enzimelor: TGP, TGO și fosfataza alcalină. În plus, s-au determinat și colesterolul seric total și albumina serică iar datele obținute au fost încărcate și prelucrate cu ajutorul funcțiilor statistice din SPSS 18.0 la pragul de semnificație de 95%.

Capitolul 6 REZULTATE

6.1. Evaluarea biologică și a profilului farmacotoxicologic în cazul izoniazidei și a derivaților săi, administrați în suspensie

6.1.1. Evaluarea acțiunii antimicrobiene <in vitro>

6.1.1.1. Metoda concentrațiilor absolute

Rezultatele obținute în cazul evaluării acțiunii antimicrobiene sunt prezentate în figura 6.1.



Fig. 6.1. Acțiunea antimicrobiană a izoniazidei și derivaților săi (HIN-a, HIN-b and HIN-c)

Creșterea bacilor tuberculoși este foarte lentă, primele colonii încep să apară pe mediul solid după 10-15 zile, devenind mature abia după 3-4 săptămâni. Pe mediul Löwenstein-Jensen folosit la acest test, coloniile de *M. tuberculosis* au aspect de colonii uscate, proeminente, de culoare gălbuie. De la eprubeta nr. 1 pana la eprubeta nr. 11 nu a existat creștere, ceea ce ne-a determinat să declarăm tulpina sensibilă la diluțiile testate (1, 2 și 4 $\mu\text{g/ml}$). Pe de altă parte, solventul folosit la prepararea diluțiilor substanțelor testate (eprubeta nr 23), după 28 de zile de incubare, a permis creșterea tulpinii bacteriene *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177.

6.1.1.2. Determinarea Concentrațiilor Minime Inhibitorii (CMI)

Tabel 6.I. Activitatea in vitro a HIN-ului și a derivaților săi împotriva *M. tuberculosis*

Compus	MW (Masa moleculară)	CMI (μg/ mL)	CMI (μM)
HIN	137,14	0.12	0.87
HIN-a	225,25	0.84	3.72
HIN-b	270,25	4.166	15.41
HIN-c	304,15	1.785	5.868

Toți compușii sunt activi pe tulpina de referință, *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177, la diferite Concentrații Minime Inhibitorii, ceea ce înseamnă că reacția de condensare cu cele trei benzaldehide nu afectează negativ efectul terapeutic al izoniazidei. Așadar, compușii pot fi considerați biologic activi și cu potențială utilizare în tratamentul tuberculozei.

6.1.1.3. Determinarea Diametrului Zonei de Inhibiție

Modificările chimice realizate la grupare funcțională amino a izoniazidei, respectiv reacțiile de blocare prin condensare cu benzaldehide, au schimbat profilul biologic al derivaților de HIN obținuți. Rezultatele obținute evidențiază pentru izoniazidă și derivații acesteia obținuți prin sinteză, un spectru antimicrobian extins, nelimitat la specia *M. tuberculosis*, acesta incluzând specii Gram pozitive și fungice. Isoniazida și derivații sintetizați nu au prezentat acțiune față de speciile Gram negative testate. De asemenea, rezultatele demonstrează că diferite modulări structurale ale izoniazidei, pot influența favorabil activitatea antimicrobiană.

Tabelul 6.II. Diametrele zonelor de inhibiție ale creșterii microbiene (mm) pentru bacteriile Gram pozitive, Gram negative și fungi.

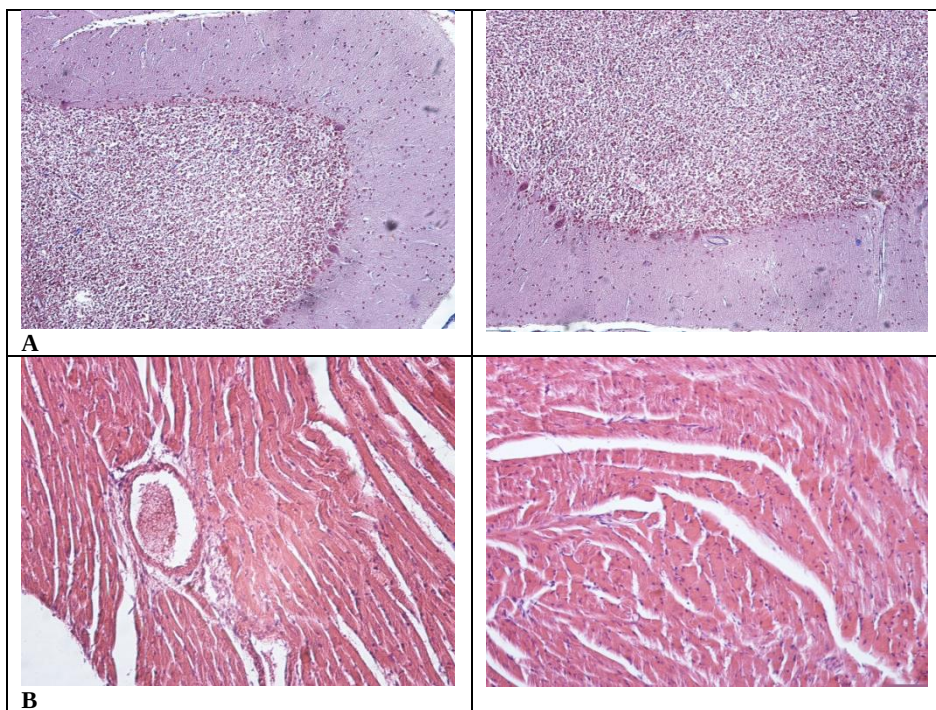
Proba	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> ATCC 14053
HIN	13	0	0	15	16
HIN-A	15	0	0	13	15
HIN-B	15	0	0	12	13
HIN-C	12	0	0	12	14
DMSO	0	0	0	0	0
Ciprofloxacin 5μg/disc	26	30	25	-	-
Fluconazol 25 μg/disc	-	-	-	28	29
Voriconazol 1 μg/disc	-	-	-	25	24

6.1.2. Efectuarea screeningului toxicologic. Determinarea toxicității acute.

Conform rezultatelor obținute, se poate observa că toxicitatea derivaților HIN.a, HIN.b și HIN.c este mai scăzută, având valori ale DL₅₀ cuprinse în intervalul 352,34-1778,8 mg/kg corp, față de izoniazida, compusul de plecare (HIN) a cărei DL₅₀ este de 175,2 mg/kg corp. Astfel prin condensarea izoniazidei cu cele trei benzaldehide aromatice, s-a obținut reducerea semnificativă a toxicității acute a acestora, compușii rezultați, respectiv HIN-b și HIN-c, putând fi încadrați în categoria substanțelor cu toxicitate moderată, în timp ce HIN-a face parte alături de izoniazida părinte (HIN), din categoria substanțelor foarte toxice.

Studiul histopatologic (toxicitatea acută)

În cazul evaluării DL, au fost examinate fragmente de creier, cord, rinichi, pulmon și ficat (figura 6.5), prelevate de la animalele de laborator folosite la testul toxicității acute. Raportat la lotul control, s-a constatat faptul că la nivel cerebral, cardiac și hepatic, administrarea dozelor de izoniazidă nu a determinat modificări; în schimb, la nivel pulmonar și renal apar anumite modificări. Astfel, desenul pulmonar este accentuat, cu distrucția spațiilor și pereților alveolari, congestie vasculară și zone de inflamație. La nivel renal, s-au evidențiat necroze tubulare însoțite de arii inflamatorii, care se extind adânc în parenchimul renal, urmând de cele mai multe ori traiectul tubulilor renali.



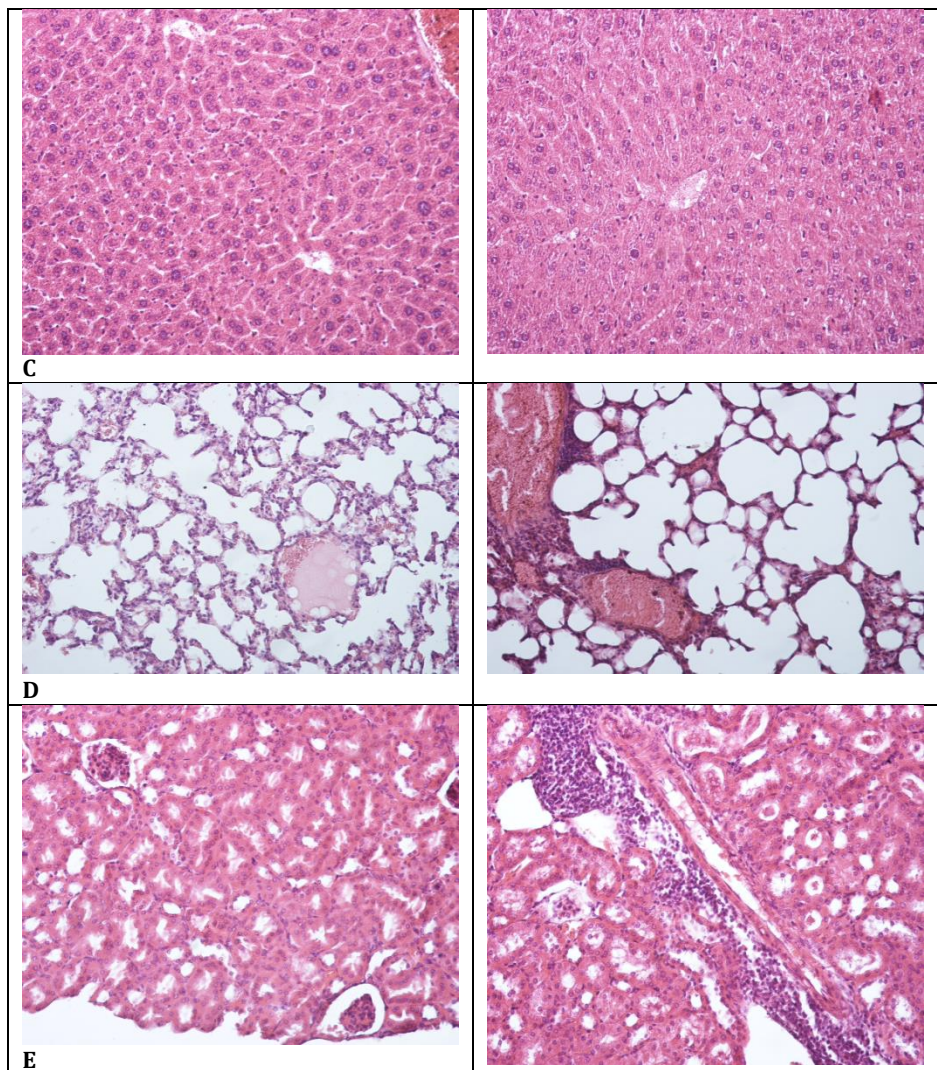


Fig. 6.5. Reactivitatea țesutului cerebral (A), cardiac (B), hepatic (C), pulmonar (D) și renal(E) la evaluarea dozei letale la lotul control/lot DL. Col.HE, x20.

6.1.3. Determinarea toxicității cronice. Efectuarea studiului histopatologic

Pentru a evalua impactul administrării compușilor analizați, administrați în formă liberă, neîncapsulată, asupra producerii de leziuni hepatice, au fost examinate fragmente de ficat, prelevate de la primele 6 loturi luate în studiu și detaliate la secțiunea Material și metode. Studiul histopatologic al fragmentelor de ficat prelevate de la fiecare lot în parte,

a permis evaluarea modificărilor induse de administrarea cronică de izoniazidă și derivații acesteia, în suspensie.

Lotul control netratat (lotul 11) a relevat o morfologie hepatică normală, cu cordoane regulate, de hepatocite uni- sau binucleate, care radiază de la vena centrolobulară, sinusoid de aspect normal și o configurație normală a întregului parenchim hepatic (Fig.6.6, Fig.6.7).

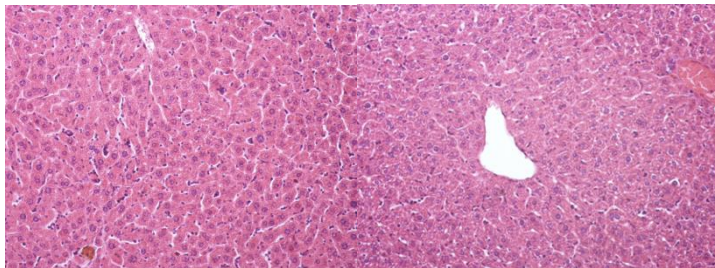


Fig. 6.6. Morfologie hepatică normală.

Fig. 6.7. Venă centrolobulară, cordoane radiare de hepatocite.

Lotul 1 (care a primit HIN) a prezentat alterări consistente la nivel hepatic: parenchimul hepatic prezintă zone întinse de inflamație și necroză celulară (Fig.6.8, Fig.6.9), precum și arii bine definite de steatoză microveziculară, care atestă toxicitatea izoniazidei asupra țesutului hepatic.

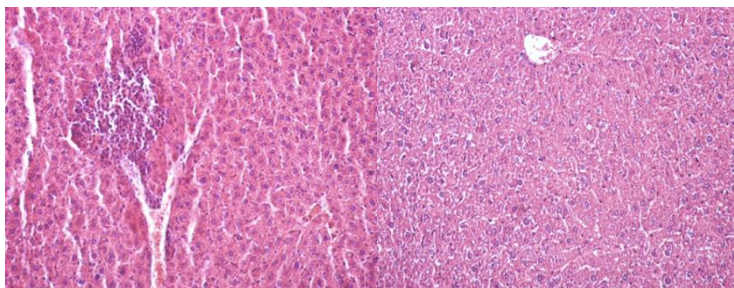


Fig. 6.8. Ficat- zone de necroză celulară. **Fig. 6.9.** Ficat- Venă centrolobulară.

În acest caz, secțiunea realizată la nivel hepatic evidențiază steatoză microveziculară, considerată totuși a fi o leziune reversibilă (Andert A., et al.,2017) după întreruperea tratamentului. Astfel, hepatocitele prezintă în citoplasmă vezicule mici, optice goale, cu limite nete situate în jurul nucleului.

Lotul 2 (care a primit HIN-a) a prezentat, de asemenea, semne de suferință tisulară hepatică, relevată prin frecvente congestii vasculare, inflamații difuze și debut de necroză celulară. Congestia vasculară este dată de acumularea de hematii în lumenul vaselor sangvine.

Lotul 3 (care a primit HIN-b) a relevat prezența de infiltrat inflamator limfocitar perivascular precum și de inflamații peri- și intrasinusoidale, congestii capilare, necroze manifestate prin nuclei picnotici și/ sau umbre nucleare.

Lotul 4 (care a primit HIN-c) a prezentat cele mai reduse semne de alterare a parenchimului hepatic, comparativ cu celelalte loturi similare: doar o ușoară congestie vasculară. Morfologia normală în cazul acestui lot, este caracterizată prin prezența hepatocitelor dispuse sub formă de cordoane radiare, având dimensiuni uniforme, cu citoplasma eozinofilă și/sau granulară, focal cu vacuole citoplasmice optice goale și unul sau mai mulți nuclei situați central, rotunzi / ovalari, congestia vasculară fiind redusă.

Lotul 5 (care a primit o soluție simplă de CMC-Na 1%) nu a prezentat modificări ale citoarhitectoniei hepatice. Morfologia normală în cazul acestui lot este caracterizată prin prezența de hepatocite cu dimensiuni uniforme, cu citoplasma eozinofilă și/sau granulară, focal cu vacuole citoplasmice optice goale (de grăsime) și unul sau mai mulți nuclei situați central, rotund/ ovalari. Hepatocitele sunt dispuse sub formă de cordoane care converg spre vena centrolobulară care prezintă infiltrat hematic intraluminal.

6.1.4. Evaluarea biocompatibilității in vitro a probelor neîncapsulate utilizând analiza viabilității celulelor MTT

Evaluarea biocompatibilității in vitro, prin contactul probelor cu fibroblaste de șoarece NCTC (929 clone), pentru o perioadă de 24 ore, indică o viabilitate celulară crescută, în cazul derivaților de izoniazidă, testați la concentrația finală de 1.75 mg / mL. Astfel, în cazul probelor HIN-b și HIN-c, viabilitatea celulară este mai mare (87,73%, respectiv 88,97%) comparativ cu cea a controlului negativ HIN (84,02%).

După 48 și 72 de ore de testare, pulberile analizate, în special HIN-a și INH-b, au indus o citotoxicitate crescătoare, cu valori ale viabilității celulare cuprinse între 55,30% și 61,16% (la 48 ore) și 50,58% și 53,14% (la 72 ore), valori similare cu cele ale compusului de referință HIN (55,15% la 48 de ore și 46,04% la 72 de ore) (tabel 6.IV), toate aceste valori încadrând probele testate la limita dintre compușii ușor citotoxici și cei moderat citotoxici. Cea mai noncitotoxică probă, la toate cele trei intervale (24, 48 și 72 de ore) a fost HIN-c, pentru care s-a înregistrat o viabilitate celulară de 88,97% (la 24 ore), respectiv la 72,47% (la 72 ore). Aceste valori, încadrează compusul HIN-c la limita dintre compușii non-citotoxici și cei ușor citotoxici. Dintre toate probele analizate, respectiv toți cei trei derivați de izoniazidă, cea mai mare rată de proliferare, similară cu cea a controlului netratat, o prezintă compusul HIN-c. Aspectul morfologiei celulare, în cazul utilizării acestei probe, confirmă rezultatul viabilității obținut prin testul MTT, sugerând astfel o bună biocompatibilitate cu fibroblastele NCTC.

6.1.5. Evaluarea parametrilor biochimici

6.1.5.1. Alaninaminotransferaza (ALAT)/ Transaminaza Glutamic-Piruvică (TGP)

Integritatea celulară a ficatului animalelor incluse în acest studiu a fost evaluată prin testarea activității enzimelor hepatice: TGP, TGO, fosfataza alcalină, colesterol seric total și albumina serică.

În cazul administrării substanțelor în formă neîncapsulată, în suspensie de CMC-Na 1% (0,1 ml/kg corp), prin analiza rezultatelor obținute se constată că cele mai mari

valori medii ale TGP s-au regăsit la lotul de animale care a primit izoniazidă (106,20 U/L- lot 1-HIN), valori semnificativ mai crescute comparativ cu cele înregistrate în celelate grupuri studiate, care au primit derivații corespunzători: HIN-a (91,09 U/L), HIN-b (86,75 U/L) și HIN-c (84,87 U/L). Cele mai mici valori medii ale TGP s-au regăsit la lotul netratat (23,70 U/L- lot 11) și lotul CMC-Na 1% (0,1 ml/kg corp) (27,01 U/L-lot 5).

6.1.5.2. *Aspartataminotransferaza (ASAT)/ Transaminaza Glutamic-Oxalacetică (TGO)*

În ceea ce privește stabilirea valorilor TGO, în cazul administrării substanțelor în suspensie de CMC-Na 1% (0,1 ml/kg corp), prin analiza rezultatelor obținute se constată că cele mai mari valori medii s-au regăsit la lotul de animale care a primit izoniazidă (166,58 U/L - lot 1-HIN), valori mai crescute comparativ cu cele înregistrate în celelate grupuri studiate, care au primit derivații corespunzători: HIN-a (154,89 U/L), HIN-b (152,18 U/L) și HIN-c (151,21 U/L). Cele mai mici valori medii ale TGO s-au regăsit la lotul Control netratat (74,76 U/L - lot 11) și lotul CMC-Na 1% (0,1 ml/kg corp) (73,87 U/L - lot 5).

6.1.5.3. *Fosfataza alcalină*

Cele mai mari valori medii ale fosfatazei alcaline s-au regăsit la lotul HIN (189,74 U/L- lot 1), valori semnificativ mai crescute față de cele înregistrate în grupurile CMC-Na (96,69 U/L; $p=0,001$) și Control netratat (97,21 U/L; $p=0,001$) care au fost cele mai mici valori medii ale fosfatazei alcaline.

6.1.5.4. *Colesterolul total*

Cele mai mari valori medii ale colesterolului seric total s-au regăsit la lotul HIN (57,64 mg/dl- lot 1), valori mai crescute față de cele înregistrate în grupurile CMC-Na (51,24 mg/dl; $p=0,001$) și Control netratat (51,66 mg/dl; $p=0,001$) care au fost cele mai mici valori medii ale colesterolului (fig. 6.22). În cazul loturilor care au primit ceilalți derivați de izoniazidă neîncapsulați, colesterolul seric total a fost cuprins între 54,07 și 54,84 mg/dl.

6.1.5.5. *Albumina serică*

Cele mai mari valori medii ale albuminei serice s-au regăsit la lotul CMC-Na (4,61 g/dl- lot 5) dar și la lotul de animale care au primit HIN (4,18 g/dl- lot 1). Cele mai mici valori ale albuminei serice s-au înregistrat în cazul lotului de animale care au primit HIN-a (3,23 g/dl- lot 2), valori apropiate de cele înregistrate în cazul animalelor din lotul netratat (3,15 g/dl- lot 11).

6.2. Evaluarea profilului farmacotoxicologic al izoniazidei și derivaților săi, administrați în formă microîncapsulată

6.2.1. Determinarea toxicității cronice. Efectuarea studiului histopatologic

Studiul histopatologic al fragmentelor de ficat prelevate de la fiecare lot în parte, a permis evaluarea modificărilor induse de administrarea cronică de izoniazidă și derivații

acesteia, în suspensie (prezentate în subcapitolul 6.1), comparativ cu administrarea acestor compuși în formă încapsulată, prezentați în acest subcapitol.

Lotul 6 (care a primit microparticule cu HIN) a prezentat puține semne de alterare hepatică, manifestate doar prin dilatații sinusoidale, cu rare reacții inflamatorii (infiltrat inflamator mononuclear intracapilar) (Fig.6.24, Fig.6.25). În acest caz, debutul de necroze celulare se caracterizează prin prezența nucleilor picnotici și/ sau umbrelor nucleare.

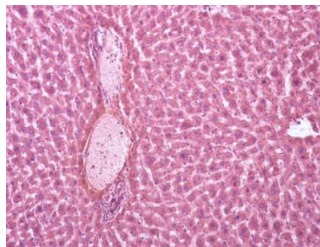
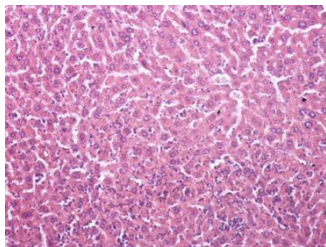


Fig. 6.24. Debut de necroze. **Fig.6.25.** Mici zone de inflamație perivasculară

Lotul 7 (care a primit microparticule cu HIN-a) a prezentat, de asemenea, o dilatare pronunțată a sistemului capilar sinusoidal, fără necroze, cu rare infiltrate inflamatorii (Fig.6.26, Fig.6.27). În plus, hepatocitele au o morfologie normală, cu dimensiuni regulate, citoplasma eozinofilă și/sau granulară, focal cu vacuole citoplasmice optice goale (de grasime) și unul sau mai mulți nucleoli situați central, rotunzi/ ovalari. De asemenea, au fost descrise zone de congestie vasculară caracterizate prin frecvente hematii în interiorul lumenului vascular.

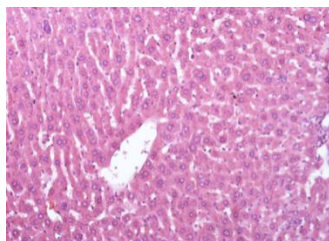
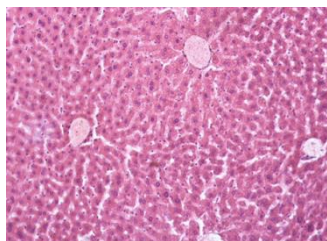


Fig. 6.26. Zone de congestie vasculară. **Fig. 6.27.** Arii de inflamație reduse

În cazul lotului 8 (care a primit microparticule cu HIN-b) a relevat zone de congestii vasculare ample, caracterizate prin infiltrat hematic abundent în interiorul lumenului vascular. În plus se observă lipsa zonelor de necroză celulară, descrise în cazul administrării derivatului HIN-b neîncapsulat. În concluzie, în cazul acestui lot, morfologia hepatică are aspect normal, prezentând rare sinusoidale ușor dilatate.

Pentru Lotul 9 (care a primit microparticule cu HIN-C) – o parte din hepatocite prezintă citoplasma de aspect fin vacuolar. Lotul 10 care a primit microparticule goale de chitosan, prezintă vena centrolobulară și hepatocitele cu o morfologie cu aspect normal.

Lotul 11 control netratat a relevat o morfologie hepatică normală, cu cordoane de hepatocite care radiază de la vena centrolobulară și o configurație normală a parenchimului hepatic (Fig.6.32).

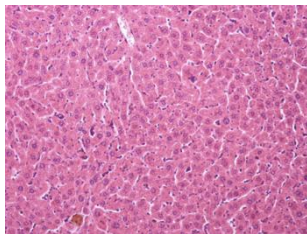


Fig. 6.32.Morfologie hepatică normală.

6.2.2. Evaluarea biocompatibilității in vitro a probelor încapsulate utilizând analiza viabilității celulelor MTT

În cadrul testului de evaluare a biocompatibilității, pentru microparticulele corespunzătoare (CS-HIN și derivații CS-HIN-a, b și c), s-a evidențiat o biocompatibilitate bună pentru derivații HIN-b și HIN-c microîncapsulați, la toate cele trei intervale, aceștia prezentând valori ale viabilității celulare cuprinse între 80.22 – 106.54%. Valorile înregistrate în cazul derivaților încapsulați au fost apropiate de cele ale microparticulelor goale de chitosan (CS), 90,92-98,32%, folosit ca și control negativ (tabel 6.V).

Comparând aceste rezultate cu cele obținute în cazul derivaților neîncapsulați, se poate observa o îmbunătățire a citotoxicității prin încapsulare în chitosan, evidențiată prin înregistrarea unor valori mai mari ale procentului de viabilitate celulară. Derivatul cu cea mai mare viabilitate celulară la 72 de ore, HIN-c, a prezentat în formă încapsulată un procent de 94,14%, în timp ce în formă neîncapsulată procentul a fost de 72,47%.

Tabel 6.V. Viabilitatea celulară (%) pentru derivații de izoniazidă și microparticulele corespunzătoare la 24 h, 48 h și 72 h

Probe testate	Viabilitatea celulară (%)		
	24 h	48 h	72 h
Control netratat	100	100	100
H ₂ O ₂ 0.03% -control pozitiv	11.99	5.02	2.90
CS (control negativ)	98.23	97.10	90.92
CS-HIN (compus de referință)	100,27	98,37	95,53
CS-HIN-a	83.92	71.08	63.99
CS-HIN-b	106.54	99.09	89.64
CS-HIN-c	94.96	80.22	94.14

(unde: 80-100% este pentru compuși non-citotoxici, 50-80% pentru compuși ușor citotoxici, 30-50% pentru citotoxicitate moderată și <30% pentru compuși cu citotoxicitate severă) (ISO 10993-5, Geneva 2003).

6.2.3. Evaluarea parametrilor biochimici

Integritatea celulară a ficatului animalelor incluse în acest studiu a fost evaluată prin testarea activității enzimelor hepatice: TGP, TGO, fosfataza alcalină, colesterol seric total, albumina serică.

6.2.3.1. Alaninaminotransferaza (ALAT)/ Transaminaza Glutamic-Piruvică (TGP)

În cazul administrării substanțelor în formă microîncapsulată, se observă o reducere semnificativă a acestor valori, începând de la izoniazida încapsulată (la lotul 6 – chitosan HIN: 85,75 U/L) și până la cei trei derivați încapsulați: chitosan HIN-a (lot 7 cu 78,46 U/L), chitosan HIN-b (lot 8 cu 76,20 U/L) și cea mai scăzută valoare înregistrată la lotul care a primit chitosan HIN-c (lot 9 cu 75,15 U/L).

Cele mai mici valori ale indicatorului de citoliză TGP s-au regăsit la lotul Martor care a primit microparticule goale de chitosan (22,97 U/L- lot 10) precum și la lotul Control netratat (23,70 U/L- lot 11).

6.2.3.2. Aspartataminotransferaza (ASAT)/ Transaminaza Glutamic-Oxalacetică (TGO)

În cazul administrării substanțelor în formă microîncapsulată, se observă o ușoară reducere a acestor valori, începând de la izoniazida încapsulată (la lotul 6 – chitosan HIN: 159,58 U/L) și până la cei trei derivați încapsulați: chitosan HIN-a (lot 7 cu 147,13 U/L), chitosan HIN-b (lot 8 cu 145,06 U/L) și chitosan HIN-c (lot 9 cu 145,18 U/L). Cele mai mici valori ale indicatorului TGO s-au regăsit la lotul Martor care a primit microparticule goale de chitosan (76,28 U/L) precum și la lotul Control netratat (74,76 U/L - lot 11).

6.2.3.3. Fosfataza alcalină

Cele mai mari valori medii ale fosfatazei alcaline s-au regăsit la lotul HIN încapsulat (182,06 U/L- lot 6), valori semnificativ mai crescute față de cele înregistrate în grupurile CMC-Na (96,69 U/L; $p=0,001$), Chitosan Martor (91,08 U/L; $p=0,001$) și Control netratat (97,21 U/L; $p=0,001$) care au avut cele mai mici valori medii ale fosfatazei alcaline. În cazul derivaților de izoniazidă administrați în formă încapsulată (loturile 7-9), se înregistrează o ușoară scădere a fosfatazei alcaline, cu valori cuprinse între 175,44 și 179,56 U/L.

6.2.3.4. Colesterolul total

Cea mai mare valoare medie a colesterolului seric total s-a regăsit la lotul HIN încapsulat (56,98 mg/dl- lot 6), valori mai crescute față de cele înregistrate în grupurile – martor chitosan (51,12 mg/dl; $p=0,001$) și Control netratat (51,66 mg/dl; $p=0,001$) care au avut cele mai mici valori medii ale colesterolului (fig. 6.38). În cazul loturilor care au primit derivați de izoniazidă HIN-a, HIN-b și HIN-c încapsulați, colesterolul seric total a fost cuprins între 53,11 și 54,08 mg/dl.

6.2.3.5. Albumina

Cele mai mici valori medii ale albuminei serice s-au regăsit la lotul netratat (3,15 g/dl- lot 11) dar și la loturile de animale care au primit derivați de izoniazidă în formă încapsulată, loturile 6-9, cu valori cuprinse între 3,36 și 3,66 g/dl. Cea mai mare valoare a albuminei serice s-a înregistrat în cazul lotului de animale care a primit microparticule goale de chitosan, lotul 10 (4,28 g/dl).

6.2.4. Studiu comparativ al parametrilor biochimici pe toate cele 11 loturi de animale (pentru substanțe neîncapsulate și încapsulate)

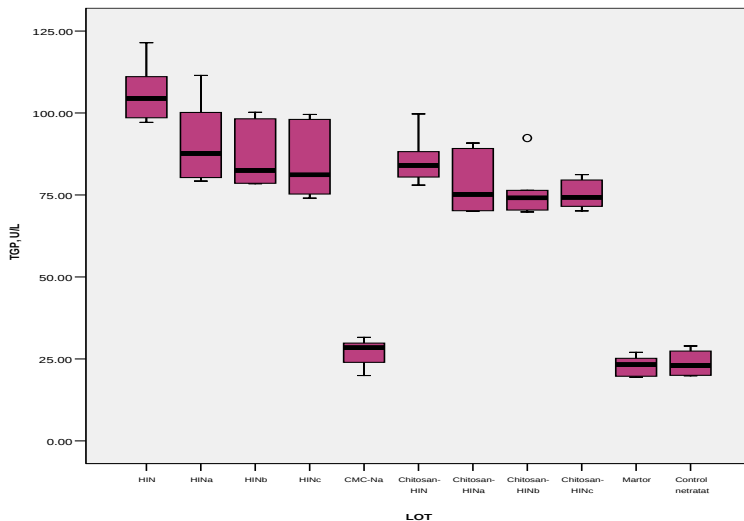


Fig. 6.40. Valori medii ale TGP comparativ pe toate loturile de studiu

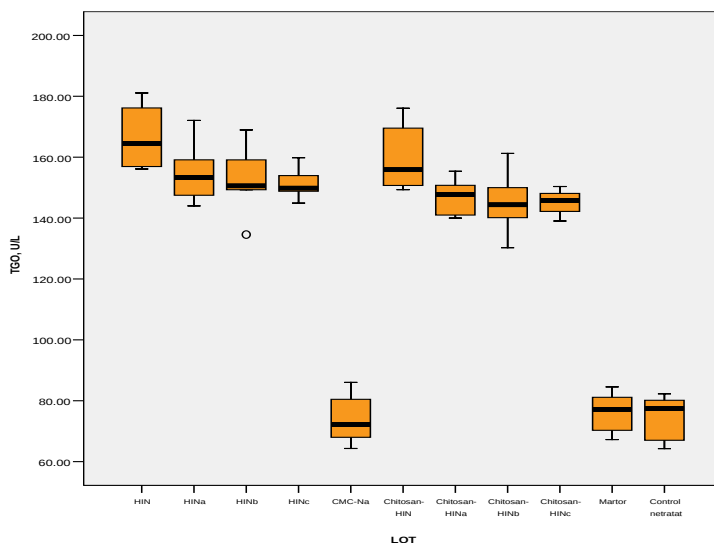


Fig.6.41. Valori medii ale TGO comparativ pe toate loturile de studiu

Valoarea mediană apropiată de valoarea medie a grupului sugerează că seria de valori a TGP-ului a fost omogenă, deci se pot aplica teste de semnificație pentru variabile continue. Comparând valorile TGP din toate loturile studiate (figura 6.40), se poate observa o ușoară scădere a acestor valori, în cazul loturilor care au primit substanțe încapsulate, comparativ cu loturile substanțelor administrate în suspensie.

Valoarea mediană apropiată de valoarea medie a grupului, sugerează că seria de valori a TGO-ului a fost omogenă. Comparând toate valorile între ele, ca în cazul determinării valorilor TGP, și în cazul enzimei TGO are loc o reducere ușoară a valorilor corespunzătoare microcapsulelor cu conținut în substanțe active (figura 6.41).

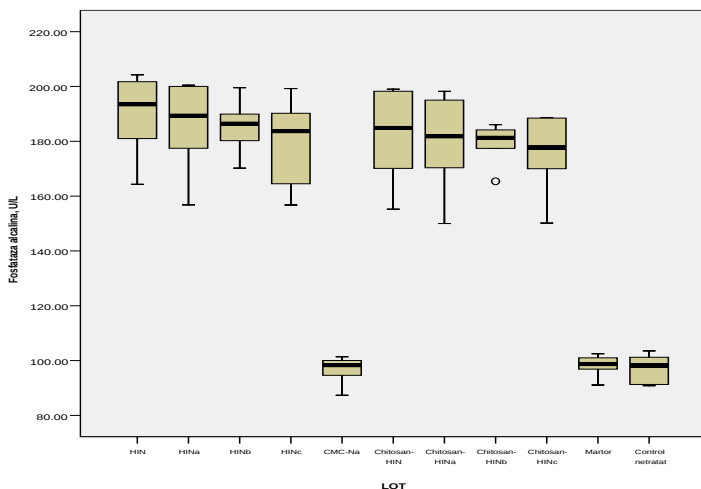


Fig. 6.42. Valori medii ale fosfatazei alcaline (FAL) comparativ pe toate loturile de studiu

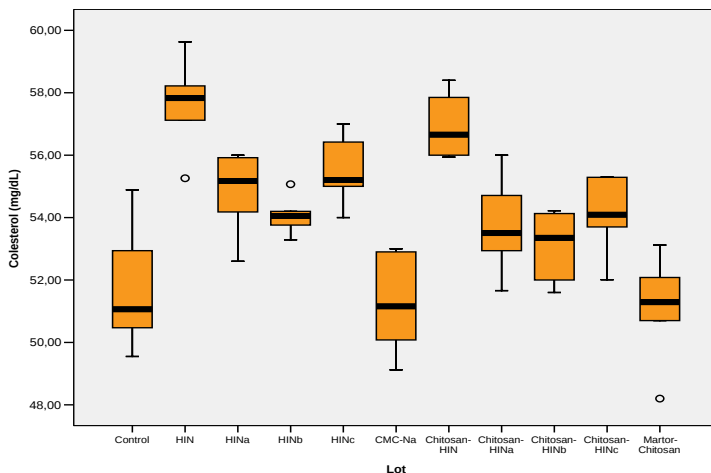


Fig.6.43. Valori medii ale colesterolului comparativ pe toate loturile de studiu

Cu cât valoarea mediană este mai apropiată de valoarea medie a grupului, seria de valori pentru FAL este mai omogenă. Și în această serie de determinări s-a sesizat o ușoară scădere a fosfatazei alcaline, atingând un minim de 175,44 U/L în cazul încapsulării derivatului HIN-c (figura 6.42).

Valoarea mediană apropiată de valoarea medie a grupului sugerează că seria de valori a colesterolului seric total a fost omogenă, deci se pot aplica teste de semnificație pentru variabile continue. Comparând valorile colesterolului din toate loturile studiate (figura 6.43), se poate observa o scădere semnificativă a acestora, în cazul loturilor care

au primit substanțe încapsulate, comparativ cu loturile substanțelor administrate în suspensie.

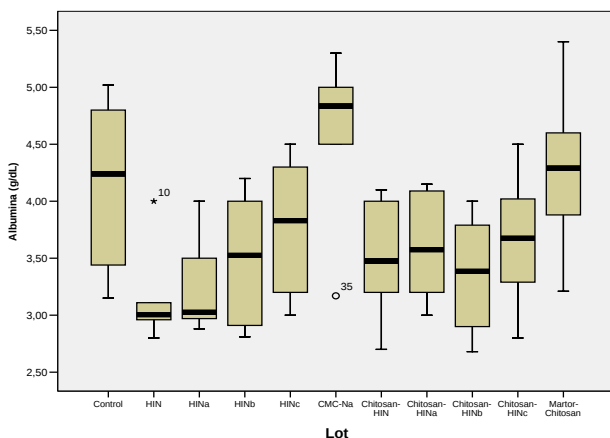


Fig.6.44. Valori medii ale albuminei serice comparativ pe toate loturile de studiu

Valoarea mediană apropiată de valoarea medie a grupului sugerează că seria de valori a albuminei serice a fost omogenă, deci se pot aplica teste de semnificație pentru variabile continue. Comparând valorile albuminei serice din toate loturile studiate (figura 6.44), se poate observa o creștere semnificativă a acestor valori, în cazul loturilor care au primit substanțe încapsulate, comparativ cu loturile substanțelor administrate în suspensie. Această creștere este cu atât mai importantă cu cât în afectarea hepatică se înregistrează hipoalbuminemie.

6.2.5. Corelația markerilor hepatici la animalele de laborator tratate cu izoniazidă și derivați neîncapsulați

La animalele tratate cu HIN și derivați neîncapsulați, TGP s-a corelat semnificativ cu:

- corelații directe, de intensitate crescută cu TGO ($r = +0,903$; $p = 0,001$), fosfataza alcalină ($r = +0,893$; $p = 0,001$) și colesterol ($r = +0,812$; $p = 0,001$);
- corelație indirectă, moderată ca intensitate cu albumina ($r = -0,660$; $p = 0,001$).

La animalele tratate cu HIN și derivați neîncapsulați, TGO s-a corelat semnificativ cu:

- corelații directe, de intensitate crescută cu fosfataza alcalină ($r = +0,913$; $p = 0,001$) și colesterol ($r = +0,758$; $p = 0,001$);
- corelație indirectă, moderată ca intensitate cu albumina ($r = -0,668$; $p = 0,001$).

La animalele tratate cu HIN și derivați neîncapsulați, fosfataza alcalină s-a corelat semnificativ cu:

- colesterolul, direct, intensitate moderat-crescută cu ($r = +0,708$; $p = 0,001$);
- albumina, indirect, cu intensitate moderată ($r = -0,695$; $p = 0,001$).

La animalele tratate cu HIN și derivați, corelația dintre colesterol și albumină a fost indirectă, moderată ca intensitate, semnificativă din punct de vedere statistic ($r = -0,439$; $p = 0,015$).

6.2.6. Corelația markerilor hepatici la animalele de laborator tratate cu izoniazidă și derivați încapsulați în chitosan

La animalele de laborator tratate cu substanțe încapsulate în chitosan, TGP s-a corelat semnificativ cu:

-TGO ($r = +0,920$; $p = 0,001$) și fosfataza alcalină ($r = +0,924$; $p = 0,001$), corelații directe, de intensitate crescută și colesterolul ($r = +0,665$; $p = 0,001$) moderat ca intensitate;

-corelație indirectă, moderată ca intensitate cu albumina ($r = -0,474$; $p = 0,008$).

La animalele de laborator tratate cu microparticule de chitosan, TGO s-a corelat semnificativ cu:

-corelații directe, de intensitate crescută cu fosfataza alcalină ($r = +0,896$; $p = 0,001$) și moderată cu colesterolul ($r = +0,671$; $p = 0,001$);

-corelație indirectă, moderată ca intensitate cu albumina ($r = -0,464$; $p = 0,01$).

La animalele de laborator tratate cu substanțe microîncapsulate în chitosan, fosfataza alcalină s-a corelat semnificativ cu:

-colesterolul, direct, moderat ca intensitate ($r = +0,591$; $p = 0,001$);

-albumina, indirect, moderat ca intensitate ($r = -0,379$; $p = 0,039$).

La șoarecii tratați cu chitosan, corelația dintre colesterol și albumină a fost indirectă, redusă ca intensitate ($r = -0,221$; $p = 0,240$), însă rezultatul nu poate fi extrapolat la populația generală.

Capitolul 7 DISCUȚII

În cazul administrării unor substanțe chimice, reprezentate de medicamente administrate în mod voit sau nu, în supradoză, sau chiar la administrarea acestora în doze terapeutice, apare procesul de lezare a hepatocitelor. De asemenea, substanțe chimice care pot afecta hepatocitul pot fi și cele utilizate în laboratoare sau la nivel industrial, dar și remediile pe bază de plante. Hepatotoxicitatea, ca efect advers al medicamentelor, reprezintă o reacție comună, identificată nu doar în cursul dezvoltării de noi entități moleculare cu efect terapeutic, ci și odată cu aprobarea utilizării medicamentelor, pe scară largă, pentru diferite afecțiuni. În studiile de toxicologie preclinică, hepatotoxicitatea este o piedică majoră în calea elaborării de noi medicamente, ficatul fiind organul cel mai expus reacțiilor adverse induse de utilizarea acestora. În plus, comparativ cu alte țesuturi, ficatul este cel mai expus la concentrații mari de medicament, atunci când acesta este administrat pe cale orală.

În cazul izoniazidei, studiată în această lucrare, după metabolizarea acesteia la nivelul ficatului, are loc producerea de radicali liberi centrați pe azot, care generează specii reactive de oxigen ce acționează ca stimulatori ai peroxidării lipidelor, determinând în cele din urmă moartea celulelor și necroza hepatică. De asemenea, majoritatea

substanțelor chimice hepatotoxice, afectează ficatul în principal prin inducerea peroxidării lipidelor, prin mecanism direct sau indirect. La animalele de laborator, radicalii peroxi mediază peroxidarea lipidelor distrugând astfel integritatea membranei celulare, ceea ce duce la leziuni hepatice, ateroscleroză și leziuni renale (Singh C., et al., 2014).

Îmbunătățirea profilului farmacotoxicologic al izoniazidei, prin introducerea unor modificări chimice în structura sa principală, cu scopul de a spori răspunsul biologic la *Mycobacterium tuberculosis*, de a reduce toxicitatea hepatică sau de a evita fenomenele de rezistență, continuă să fie o provocare științifică din ce în ce mai atractivă.

În cadrul modificărilor chimice realizate, s-a urmărit transformarea izoniazidei hidrofile într-o serie de derivați lipofili, acest lucru fiind realizabil prin creșterea greutatei moleculare a compușilor rezultați, odată cu adăugarea unor hidrocarburi hidrofobe la gruparea amino liberă a compusului părinte. Ca urmare, creșterea masei moleculare va determina creșterea lipofilității / hidrofobității compusului. Această proprietate ar putea avea o influență pozitivă asupra activității antimicrobiene a compușilor rezultați, însă există și studii care au demonstrat faptul că ar putea exista și alți factori, înafara proprietăților de hidrofobie, care să influențeze absorbția și distribuția unui medicament tuberculostatic în interiorul tulpinii *M. tuberculosis*. Printre factorii menționați, ar putea fi proprietățile structurale ale compușilor, mediul complex din interiorul celulei, precum și diferențele de permeabilitate ale peretelui celular între diferite tulpini (Parumasivam T., et al., 2013). Prin urmare, structura peretelui celular și capacitatea de penetrare a izoniazidei prin bariera lipidică, oferă oportunitatea unor strategii de dezvoltare de noi medicamente tuberculostatice mai puțin toxice și mai eficiente.

În studiul nostru, deși din punctul de vedere al activității antimicrobiene, s-a constatat că activitatea derivaților de izoniazidă este puțin mai scăzută decât izoniazida mamă, datorită unor valori ale concentrației minime inhibitorii mai mari, acestea se încadrează în limitele impuse de Programul Global de Descoperire a Medicamentelor Antituberculoase noi, și anume 6,25 μg/ml, ca limită superioară pentru evaluarea activității anti-tuberculoase a noilor compuși terapeutici (Rodrigues M.O., et al., 2013).

Biocompatibilitatea in vitro a evidențiat o reducere a citotoxicității derivaților de izoniazidă prin încapsulare în chitosan, înregistrându-se valori mai mari ale procentului de viabilitate celulară, cu până la 50%, spre deosebire de formele neîncapsulate. În plus, viabilitatea medie a celulelor, promovată de acești derivați (HIN-a, HIN-b și HIN-c), a fost superioară celeia din cazul izoniazidei.

Condensarea izoniazidei cu cele trei benzaldehide aromatice a dus la reducerea semnificativă a toxicității acute, prin înregistrarea unor doze letale de până la zece ori mai mari. Astfel, DL 50 a crescut semnificativ, de la 175,2 mg/kg corp (în cazul HIN-ului) la 1778,8 mg/kg corp (în cazul compusului HIN-b) și deci, pe baza rezultatelor obținute, se poate afirma că derivații studiați se încadrează în grupul substanțelor cu grad redus de toxicitate. Conform unor studii, reactivitatea ridicată a grupării amino terminale din structura izoniazidei pare să fie responsabilă de instalarea proceselor de hepatotoxicitate (Castelo-Branco F.D., et al., 2018). Din acest motiv, modificările chimice realizate la această grupare funcțională, respectiv reacțiile de blocare prin condensare cu benzaldehide, au schimbat foarte mult profilul hepatotoxicității derivaților de HIN obținuți.

În cazul nostru, la testul de toxicitate acută, prin analiza histopatologică, s-a constatat că dozele letale ale izoniazidei părinte, au produs la nivel renal, necroze tubulare însoțite de arii inflamatorii, fapt ce a condus la insuficiență renală acută urmată de moartea animalelor. Prezența leziunilor la nivel tubular indică faptul că necroza tubulară acută, responsabilă de ischemia renală, reprezintă cauza insuficienței renale acute. Încapsularea derivaților de izoniazidă analizați din punct de vedere biologic și farmacotoxicologic, folosind chitosanul ca polimer de microîncapsulare, a avut efecte benefice asupra toxicității cronice a acestora, reducând semnificativ nivelul acesteia. În observațiile histopatologice ale secțiunilor ficatului, în special animalele care au primit izoniazidă, pe parcursul celor 30 de zile, au prezentat leziuni hepatocelulare prin necroză și steatoză microveziculară.

Gradul de afectare hepatică, în cadrul prezentului studiu, în cazul compușilor neîncapsulați, a fost evidențiat prin creșterea semnificativă de aproximativ patru ori a enzimelor hepatice, pe de o parte și pe de altă parte, prin modificările histopatologice apărute la nivelul ficatului și menționate mai sus. În cazul nostru, utilizarea izoniazidei și a derivaților corespunzători, administrați în formă neîncapsulată, au determinat creșterea nivelului de colesterol total, în timp ce utilizarea chitosanului la administrarea încapsulată a acestor compuși, și-a pus amprenta semnificativă în reducerea acestor valori, prin efectul hipocolesterolemiant citat în literatura de specialitate (*Naveed M., et al., 2019*).

Afectarea hepatică este indicată, în plus, și de reducere valorilor albuminemiei, în special la loturilor de animale care au primit substanțe neîncapsulate, astfel că cele mai mici valori au fost înregistrate în cazul animalelor care au primit HIN administrat în suspensie (neîncapsulat). În cazul derivaților HIN-a, HIN-b și HIN-c se observă o creștere ușoară a valorilor albuminemiei, în timp ce încapsularea acestor compuși determină o creștere semnificativă a valorilor, ajungând să fie apropiate de cea înregistrată în cazul controlului netratat, fapt ce sugerează efectul ameliorator al chitosanului asupra albuminei serice, dar și al modificărilor chimice produse pe izoniazida părinte.

Capitolul 8 CONCLUZII

Rezultatele obținute au arătat că acțiunea antioxidantă a chitosanului poate reduce semnificativ afectarea hepatică indusă de medicamente, prin neutralizarea radicalilor liberi și inhibarea peroxidării lipidelor, mulțumită încărcării sale electropozitive, funcționând ca și cation, drept pentru care se poate fixa de membranele celulare încărcate negativ, producând unele schimbări biologice, pierderea potențialului protector și stresul oxidativ al acestora. În acest context, utilizarea microîncapsulării în chitosan a diferitor medicamente hepatotoxice, reprezintă o strategie importantă în reducerea leziunilor hepatice și deci reducerea riscului de instalare a insuficienței hepatice fulminante.

În concluzie, rezultatele obținute prezintă potențială aplicație ca agenți antimicrobieni în tratamentul tuberculozei, unde se impune atât o acțiune antimicrobiană favorabilă cât și o incidență cât mai scăzută a reacțiilor adverse, în mod deosebit în contextul toxicității ridicate în cazul medicației tuberculostatice actuale.

Bibliografie selectivă

1. Agalloco, J. P., Carleton, F.J. Validation of Pharmaceutical Processes, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2007.
2. Amin A., Hamza A.A. Oxidative stress mediates drug-induced hepatotoxicity in rats: a possible role of DNA fragmentation. *Toxicology*, 2005, 208: 367–375.
3. Andert A., et al. Grade of donor liver microvesicular steatosis does not affect the postoperative outcome after liver transplantation. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 2017, 16 (6): 617-623.
4. Błaszczyk B., Lason W., Czuczwar S.J. Antiepileptic drugs and adverse skin reactions: An update. *Pharmacological Reports*, 2015, 67: 426–434.
5. Borundel C. Medicină internă pentru cadre medicale, București, Editura All, 2010; pag. 310, 312-318, ISBN: 978-973-571-925-8.
6. Briffotiaux J., et al. MmpS5/MmpL5 as an efflux pump in Mycobacterium species. *Tuberculosis* 2017, 107: 13-19.
7. Cabané P., et al. Allotransplant of microencapsulated parathyroid tissue in severe postsurgical hypoparathyroidism: a case report. *Transplantation Proceedings*, 2009, 41(9): 3879–3883.
8. Cambau E., Drancourt M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, 20: 196–201.
9. Campagna J.D., et al. The Use of Cephalosporins in Penicillin-Allergic Patients: A Literature Review. *The Journal of Emergency Medicine*, 2012, 42: 612-620.
10. Carlson A.Q, et al. Pauci-immune glomerulonephritis in individuals with disease associated with levamisole-adulterated cocaine: a series of 4 cases. *Medicine (Baltimore)* 2014, 93: 290–7.
11. Castelo-Branco FD., et al. New hydrazides derivatives of isoniazid against Mycobacterium tuberculosis: Higher potency and lower hepatocytotoxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 146: 529-540.
12. CLSI- Clinical and Laboratory Standard Institute. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. Second Edition, 2009.
13. CLSI- Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100, 2017.
14. Naveed M., et al. Chitosan oligosaccharide (COS): An overview. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 827–843.
15. Neuman M.G., et al. Quinolones-induced hypersensitivity reactions. *Clinical Biochemistry*. 2015, 48: 716-739.
16. Ngo D-N., et al. Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 74 (2): 228–234.
17. Ogawa Y., Grant J.A. Review, Mediators of Anaphylaxis. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2007, 27: 249-260.

18. Oh S.S., et al. Acute interstitial nephritis induced by *Solanum nigrum*. *Kidney Research and Clinical Practice*, 2016, 35: 252-254.
19. Parumasivam T., et al. Anti-tuberculosis activity of lipophilic isoniazid derivatives and their interactions with first-line anti-tuberculosis drugs. *Journal of Pharmacy Research*, 2013, 7: 313-317.
20. Rodrigues M.O., et al. Synthesis and antimycobacterial activity of isoniazid derivatives from renewable fatty acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21: 6910–6914.
21. Singh C., et al. Hepatoprotective agent tethered isoniazid for the treatment of drug-induced hepatotoxicity: Synthesis, biochemical and histopathological evaluation. *Toxicology Reports*, 2014, 1: 885–893.
22. Talip B.A., et al. An Update on Global Tuberculosis (TB). *Infectious Diseases: Research and Treatment*. 2013, 6: 39–50.
23. Tan W., et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antifungal and antioxidant properties of cationic chitosan derivative via azide-alkyne click reaction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 318-324.
24. Tanaka T., Nangaku M. Pathogenesis of tubular interstitial nephritis. *Contributions to Nephrology*, 2011; 169:297–310.
25. Tasker A.L., et al. The effect of surfactant chain length on the morphology of poly(methyl methacrylate) microcapsules for fragrance oil encapsulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016, 484: 10–16.
26. Thong B., Y-H, Tan T.C. Epidemiology and risk factors for drug allergy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2011, 71(5): 684–700.
27. Wong MCS., et al. The changing epidemiology of liver diseases in the Asia-Pacific region. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2019; 16: 57-73.
28. Xie W., Xu P., Liu Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2001, 11: 1699–1701.
29. Xie Y., Liu X., Chen Q. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 2007,69: 142-147.
30. Xu M., et al. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*, 2016, 168: 52–59.