

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ЛХС-1208 НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ

Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова, О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, Т.В. Абрамова,
В.А. Чалей, А.А. Николина, В.М. Бухман

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Надежда Павловна Ермакова ne518@yandex.ru

Введение. В данной работе представлен фрагмент доклинического токсикологического изучения нового российского противоопухолевого препарата производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208 — исследование кардиотоксичности, которая является одним из специфических осложнений противоопухолевой химиотерапии.

Цель исследования — доклиническое токсикологическое изучение влияния препарата ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему животных для оценки его кардиотоксического действия.

Материалы и методы. Исследования проводились на 40 здоровых неинбредных беспородных крысах-самцах и 4 собаках породы бигль, самцах и самках. Препарат вводили ежедневно 15-кратно крысам — внутривенно в суммарных дозах 50, 100 и 200 мг/кг; собакам — внутривенно в суммарных дозах 20 и 30 мг/кг. Срок наблюдения за крысами составил 30 сут, за собаками — 60 сут. Оценивали изменения показателей электрокардиограммы, макроскопическую и гистологическую картину изменений сердца и изменения биохимических показателей активности ферментов — лактатдегидрогеназы, аспартатаминотрансферазы.

Результаты. У крыс ЛХС-1208 на протяжении всего срока наблюдения вызывал функциональные изменения показателей электрокардиограммы: увеличение интервалов PQ и QT и нарушение сердечного ритма (выпадение зубца R), что свидетельствует о нарушении электрической проводимости. Морфологические изменения в сердечной мышце были выявлены на 3-и сутки наблюдения в суммарных дозах 100 и 200 мг/кг, которые сохранялись до 30 сут наблюдения только у животных, получавших препарат в суммарной дозе 200 мг/кг. У собак на разных сроках наблюдения препарат вызывал функциональные изменения электрической активности сердца: увеличение интервала QRS, инверсию зубца T, появление глубокого зубца Q. Отмечали увеличение активности лактатдегидрогеназы и аспартатаминотрансферазы по сравнению с фоновыми показателями. Морфологические изменения в сердечной мышце были выявлены на 3-и сутки наблюдения только в суммарной дозе 30 мг/кг, которые сохранялись до 60 сут наблюдения.

Заключение. Установлено, что новый российский противоопухолевый препарат ЛХС-1208 обладает кардиотоксическим действием, вызывая функциональные изменения сердечно-сосудистой системы крыс во всех изученных дозах, а собак — только после применения препарата в максимальной дозе. Морфологически кардиотоксичность не обнаружена у животных, получавших минимальную дозу препарата, и подтверждена только у животных, получавших максимальную дозу препарата.

Ключевые слова: новый противоопухолевый препарат, производное N-гликозида индолокарбазола, кардиотоксичность, крысы, собаки

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-70-80

THE INFLUENCE OF THE DRUG LHS-1208 ON CARDIOVASCULAR SYSTEM

N.P. Ermakova, I.B. Merkulova, O.I. Konyaeva, N. Yu. Kulbachevskaya, T.V. Abramova,
V.A. Chaley, A.A. Nikolina, V.M. Bukhman

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. This article presents a fragment of a preclinical toxicological study of a new Russian anticancer drug derived from n-glycoside indolocarbazole LCS-1208 — study of cardiotoxicity, which is one of the specific complications of anticancer chemotherapy.

Objective. Preclinical toxicological study of the effect of the drug LCS-1208 on the cardiovascular system of animals to assess its cardiotoxic effects.

Materials and methods. Studies were conducted on 40 healthy non-harmless mongrel male rats and 4 dogs Beagle, male and female. The drug was administered daily 15 times to rats-intraperitoneal in total doses of 50, 100 and 200 mg/kg; to dogs — intravenously in total doses of 20 and 30 mg/kg. The period of observation of rats was 30 days, for dogs was 60 days. Changes in electrocardiogram indices, macroscopic and histological picture of heart changes and changes in biochemical parameters of enzymes activity — lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase were evaluated.

Results. In rats LCS-1208 throughout the period of observation caused functional changes in electrocardiogram: increase in PQ and QT intervals and cardiac rhythm disturbance (loss of R wave), which indicates a violation of electrical conductivity. Morphological changes

in the heart muscle were detected on the 3rd day of observation in total doses of 100 and 200 mg/kg, which remained until 30 days of observation only in animals receiving the drug in the total dose of 200 mg/kg. In some dogs for different periods of observation the drug caused functional changes in the electrical activity of the heart: an increase in the QRS interval, the inversion of the T wave, the appearance of a deep Q wave and an increase in the activity of lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase compared to background indicators. Morphological changes in the heart muscle were detected on the 3rd day of observation only in the total dose of 30 mg/kg, which persisted up to 60 days of observation.

Conclusion. It was found that the new Russian anticancer drug LHC-1208, a derivative of indocarbazole N-glycoside, has a cardiotoxic effect, causing functional changes in the cardiovascular system of rats in all doses studied, and in dogs only in the maximum dose. Morphologically, cardiotoxicity is not confirmed in animals receiving a minimal dose of the drug, but only in animals receiving the maximum dose of the drug.

Key words: new antitumor drug, derivative of N-glycosides of indolocarbazole, cardiotoxicity, rats, dogs

Введение

Кардиотоксичность является одним из специфических системных осложнений противоопухолевой химиотерапии. Прогноз осложнений кардиотоксического действия нового препарата в эксперименте на животных — одна из наиболее сложных проблем доклинической токсикологии. Влияние противоопухолевых препаратов на сердечно-сосудистую систему определяется нередко только при их клиническом применении. Проявления кардиотоксичности противоопухолевых препаратов различаются по времени возникновения: ранние, более поздние и отсроченные (спустя недели и месяцы после начала лечения). Такие проявления кардиотоксичности противоопухолевых препаратов, как изменение артериального давления, боли в сердце, нарушение сердечного ритма, развитие миокардита, перикардита, инфаркта миокарда и тяжелой сердечной недостаточности, не только снижают субъективное качество жизни онкологических больных, но иногда становятся основной причиной неназначения или отмены препарата [1–3]. Для некоторых противоопухолевых препаратов кардиотоксичность является лимитирующей. К ним относятся в основном антрациклиновые противоопухолевые антибиотики: адриамицин, эпирубицин, рубомицин, карминомицин, оливомин. Реже развивается кардиотоксичность при использовании других препаратов — циклофосфана, фторурацила, этопозиды, тенипозиды, паклитаксела, трансстимулаба, лапатиниба [1–3]. Предклиническая оценка характера кардиотропного действия противоопухолевых препаратов, прогнозирование их кардиотоксичности при применении в клинике решают конкретные вопросы безопасности их применения, а также позволяют избежать неопределенностей в диагностике изменений со стороны сердечно-сосудистой системы, возникших при фармакотерапии.

ЛХС-1208 — новый противоопухолевый препарат на основе N-гликозида индолокарбазола, был создан и изучен в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Субстанция препарата синтезирована в лаборатории химического синтеза

[4–9]. В лаборатории разработки лекарственных форм была создана инъекционная лекарственная форма — ЛХС-1208 [10]. В лаборатории экспериментальной химиотерапии изучена противоопухолевая активность и механизм противоопухолевого действия данного лекарственного средства [11–16], что стало основанием для доклинического изучения токсичности этого препарата, которое было проведено в лаборатории фармакологии и токсикологии и результаты которого были частично представлены в виде статей и тезисов [17–23].

В данной работе представлен фрагмент доклинического токсикологического изучения ЛХС-1208 — исследование кардиотоксичности.

Материалы и методы

Исследование проводили на стандартных сертифицированных животных в соответствии с российскими и международными требованиями по использованию животных моделей [24–26]. Работа проведена в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [27, 28].

Работа проведена на 40 здоровых неинбредных беспородных крысах-самцах и на 4 собаках разного пола (3 самки и 1 самец) породы бигль. Животные были получены из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животные содержались в стандартных условиях вивария.

Препарат крысам вводили внутривенно ежедневно (в течение 15 дней) в суммарных дозах 50, 100 и 200 мг/кг. Дозы для крыс рассчитывали исходя из данных, полученных в результате изучения острой токсичности на крысах. Препарат собакам вводили внутривенно ежедневно (в течение 15 дней) в суммарных дозах 20 и 30 мг/кг. Дозы для собак рассчитывали исходя из данных, полученных в результате изучения субхронической токсичности препарата на крысах. Препарат ЛХС-1208 — лиофилизат, содержащий во флаконе 9 мг активного вещества. Содержимое флакона растворяли в 3 мл воды для инъекций до получения рекомендованной концентрации — 3,0 мг

в 1 мл воды для инъекций. Объем вводимого раствора рассчитывали на основании массы тела животного в соответствии с дозой.

Взятие биологического материала — крови для биохимического исследования — проводили у собак за 3 дня до начала введения препарата (фон 1), на 0 день до введения препарата (фон 2) и на 3, 7, 14, 21, 30, 45 и 60-е сутки после последнего введения препарата. Взятие крови у крыс для биохимического исследования производили на 3-и и 30-е сутки наблюдения после последнего введения препарата. В сыворотке крови животных оценивали активности аспартат-аминотрансферазы (АСТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы оценивали с помощью электрокардиографии (ЭКГ) у собак за 3 дня (фон 1) до начала введения препарата, на 0 день до введения препарата (фон 2) и на 3, 7, 14, 21, 30, 45 и 60-е сутки после последнего введения препарата. Электрокардиограмму у крыс регистрировали за 3 дня (фон) до начала введения препарата и на 3, 15 и 30-е сутки после последнего введения препарата. Для обеспечения беспрепятственной регистрации ЭКГ крыс подвергали легкому поверхностному ингаляционному наркозу с помощью диэтилового эфира. Исследования ЭКГ проводили на электрокардиографе SCHILLER AT-1 (Швейцария) при скорости протяжки ленты 50 мм/с. Анализ ЭКГ животных проводили в соответствии с методиками [29–31] с учетом оценки биохимических показателей сыворотки крови крыс и собак. Крыс выводили из эксперимента на 3-и и 30-е сутки, а собак на 3-и и 60-е сутки наблюдения.

Для гистологического исследования брали фрагменты сердца. Материал подвергали общепринятой гистологической обработке [32]. Гистологические препараты анализировали и фотографировали при увеличениях 100, 400, используя микроскоп Leica DM1000 (Германия) со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Office и BioStat Professional. Рассчитывали параметры, обычно используемые в токсикологии. За достоверные принимали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Влияние ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему крыс

При изучении влияния ЛХС-1208 на функцию сердца установлено, что препарат при ежедневном (в течение 15 дней) внутрибрюшинном введении крысам в суммарных дозах 50, 100 и 200 мг/кг на всех сроках наблюдения вызывал изменения ЭКГ животных. Частота сердечных сокращений (ЧСС) досто-

верно уменьшалась, а интервал RR соответственно увеличивался у крыс, получивших препарат во всех дозах и на все сроки наблюдения по сравнению с фоновыми показателями, а у контрольных животных — только на 30-е сутки наблюдения (влияние многократного эфирного наркоза при регистрации ЭКГ). Частота сердечных сокращений и интервал RR у крыс, получивших препарат во всех дозах и на все сроки наблюдения, не изменялись по сравнению с показателями контрольных животных (табл. 1). При макроскопической оценке всех крыс на 3-и и 30-е сутки наблюдения макроскопические изменения в сердце не выявлены.

У крыс после введения препарата в суммарной дозе 50 мг/кг интервал PQ достоверно увеличивался на 30-е сутки наблюдения по сравнению с фоновыми показателями и недостоверно — по сравнению с данными контрольных животных (см. табл. 1). Выявлено нарушение сердечного ритма, связанного с электрической проводимостью: наблюдалась аритмия, проявляющаяся выпадением каждого 3-го или 5-го комплекса QRS, при наличии зубца Р после введения ЛХС-1208 на все сроки наблюдения у 40 % крыс. Среди контрольных животных наблюдалась такая же аритмия на 14-е и 30-е сутки наблюдения у 20 % крыс. Однако при патоморфологическом исследовании на 3-и и 30-е сутки наблюдения макроскопические и гистологические изменения в сердце не выявлены (рис. 1а), морфологическая картина миокарда крыс после введения препарата не отличалась от таковой у контрольной группы животных (рис. 1б).

Поскольку морфологически функциональные изменения, отмеченные при применении препарата в суммарной дозе 50 мг/кг, не подтверждаются, мы расцениваем эти изменения как погрешность методики регистрации ЭКГ (влияние многократного эфирного наркоза) и считаем суммарную дозу 50 мг/кг некардиотоксичной.

У крыс после введения препарата в суммарной дозе 100 мг/кг интервал QT достоверно увеличился по сравнению с фоновыми показателями и показателями контрольных животных на 3-и сутки наблюдения (см. табл. 1). При гистологическом исследовании в миокарде крыс обнаружены участки гиперэозинофильных кардиомиоцитов (участки дистрофии и ишемии) (рис. 2а). Выявленные изменения полностью обратимы к 30-м суткам опыта.

У крыс после введения препарата в суммарной дозе 200 мг/кг интервал PQ увеличился по сравнению с фоновыми показателями на 30-е сутки наблюдения (см. табл. 1). После применения препарата в суммарной дозе 200 мг/кг микроскопические изменения миокарда более выражены, чем при применении препарата в суммарной дозе 100 мг/кг. Отмечено неравномерное окрашивание кардиомиоцитов эозином,

Таблица 1. Показатели электрокардиограммы неинбредных крыс-самцов после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного введения ЛХС-1208

Доза, мг/кг, разовая/суммарная	Сутки опыта			
	фон	3-и	15-е	30-е
ЧСС, уд./мин				
3,3/50	452,2 ± 13,7	407,2 ± 26,3*	382,2 ± 19,4*	344,8 ± 32,8*
6,7/100	458,2 ± 19,2	397,8 ± 11,6*	394,2 ± 16,5*	370,0 ± 17,7*
13,3/200	477,0 ± 9,4	414,6 ± 10,8*	404,8 ± 15,0*	393,2 ± 13,5*
Контроль	432,4 ± 26,9	399,4 ± 13,1	373,2 ± 23,1	357,4 ± 23,7*
RR, с				
3,3/50	0,133 ± 0,004	0,150 ± 0,010*	0,159 ± 0,009*	0,182 ± 0,022*
6,7/100	0,138 ± 0,007	0,151 ± 0,004*	0,153 ± 0,007*	0,164 ± 0,008*
13,3/200	0,126 ± 0,003	0,142 ± 0,002*	0,149 ± 0,006*	0,153 ± 0,005*
Контроль	0,141 ± 0,009	0,151 ± 0,005	0,163 ± 0,011	0,171 ± 0,012*
PQ, с				
3,3/50	0,056 ± 0,002	0,060 ± 0,005	0,060 ± 0,005	0,074 ± 0,012*
6,7/100	0,056 ± 0,002	0,058 ± 0,005	0,060 ± 0,000	0,060 ± 0,000
13,3/200	0,050 ± 0,003	0,056 ± 0,002	0,054 ± 0,002	0,064 ± 0,004*
Контроль	0,054 ± 0,002	0,058 ± 0,002	0,062 ± 0,005	0,062 ± 0,005
QT, с				
3,3/50	0,038 ± 0,002	0,038 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,038 ± 0,002
6,7/100	0,034 ± 0,002	0,040 ± 0,000**	0,034 ± 0,002	0,036 ± 0,002
13,3/200	0,036 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,032 ± 0,002	0,034 ± 0,002
Контроль	0,036 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,034 ± 0,002	0,038 ± 0,002
QRS, с				
3,3/50	0,020 ± 0,000	0,018 ± 0,002	0,016 ± 0,002	0,020 ± 0,000
6,7/100	0,020 ± 0,000	0,020 ± 0,000	0,020 ± 0,000	0,020 ± 0,000
13,3/200	0,018 ± 0,002	0,020 ± 0,000	0,016 ± 0,002	0,020 ± 0,000
Контроль	0,018 ± 0,002	0,018 ± 0,002	0,018 ± 0,002	0,020 ± 0,000

Примечание. ЧСС – частота сердечных сокращений. * $p < 0,05$ статистически достоверно по сравнению с фоном; ** $p < 0,05$ статистически достоверно по сравнению с фоном и с контролем.

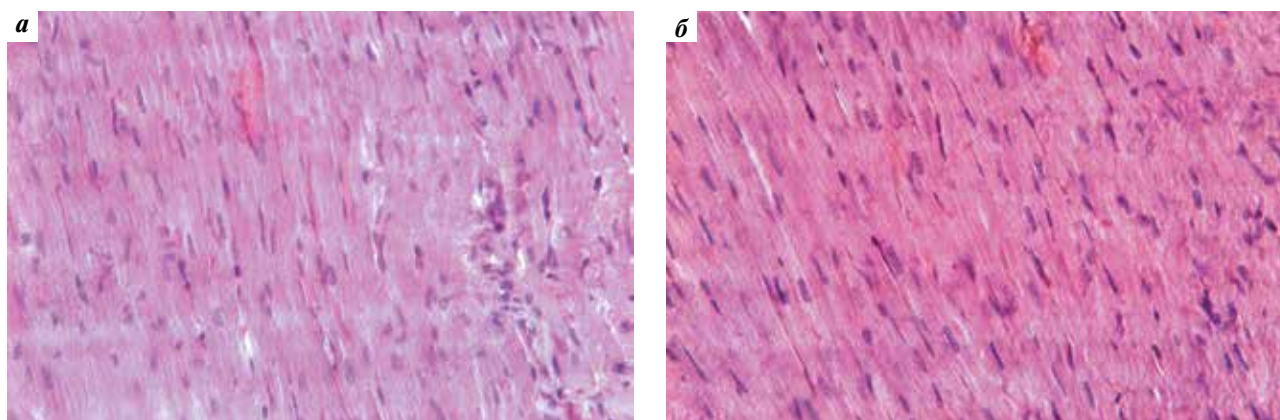


Рис. 1. Сердце (миокард) крысы. Структура мышечных волокон не нарушена: а – сердце (миокард) крысы, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 50 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Структура мышечных волокон не нарушена. Окраска: гематоксилин и эозин, $\times 400$; б – сердце (миокард) крысы. Контроль. Структура мышечных волокон не нарушена. Окраска: гематоксилин и эозин, $\times 400$

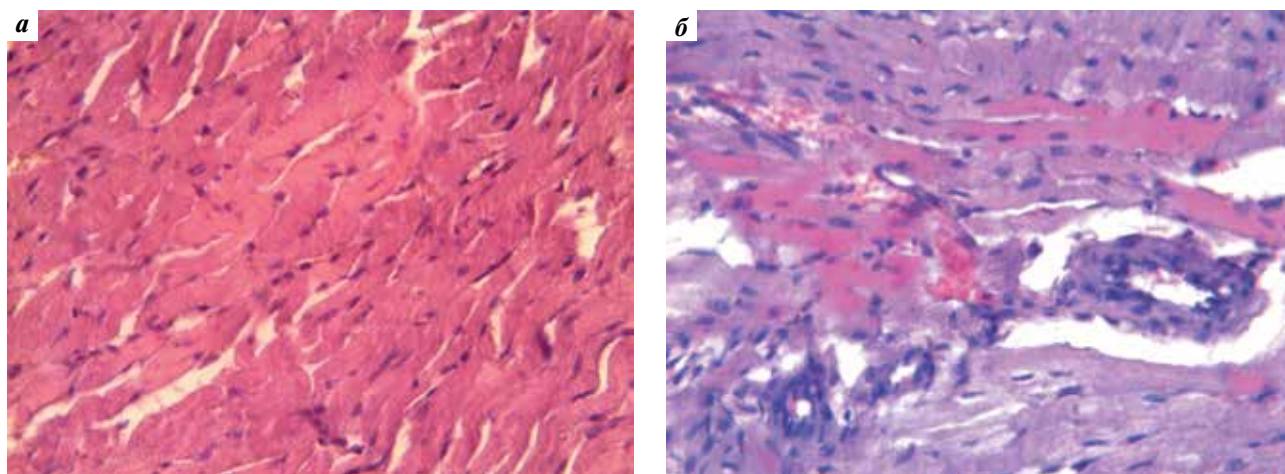


Рис. 2. Сердце (миокард) крысы. Кардиомиоциты с признаками дистрофии (набухание) и гиперэозинофилии (ишемии), 3-и сутки наблюдения: а — сердце (миокард) крысы, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 100 мг/кг. Участки гиперэозинофильных кардиомиоцитов с признаками дистрофии (набухание) и гиперэозинофилии (ишемии). Окраска: гематоксилн и эозин, $\times 400$; б — сердце (миокард) крысы, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 200 мг/кг. Кардиомиоциты с признаками дистрофии (набухание) и гиперэозинофилии (гипоксии). Окраска: гематоксилн и эозин, $\times 400$

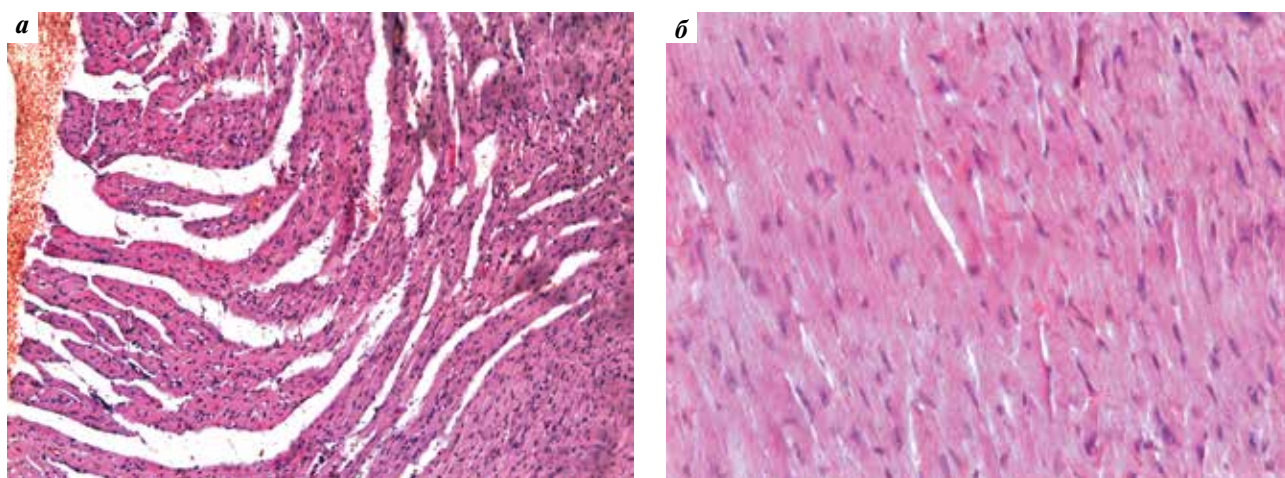


Рис. 3. Сердце (миокард) крыс, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 200 мг/кг: а — 3-и сутки наблюдения. Отек, разрыхление структуры мышечных волокон, отдельные кардиомиоциты гиперэозинофильны. Окраска: гематоксилн и эозин, $\times 100$; б — 30-е сутки наблюдения. Несильно выраженные дистрофические изменения и гиперэозинофилия некоторых кардиомиоцитов. Окраска: гематоксилн и эозин, $\times 400$

обнаружены участки отдельных кардиомиоцитов или их групп с повышенной гиперэозинофильной окраской и сильно набухшей саркоплазмой, что косвенно считают признаком гипоксии и дистрофии миокарда [33] (рис. 2б).

У отдельных крыс, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 200 мг/кг, на 3-и сутки наблюдения, кроме вышеуказанных изменений, отмечены отек и разрыхление мышечных волокон миокарда (рис. 3а). На 30-е сутки наблюдения у крыс сохраняются изменения миокарда: признаки дистрофических изменений в виде набухания и гиперэозинофилии отдельных кардиомиоцитов (рис. 3б).

Влияния ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему крыс по биохимическим показателям крови не выявлено.

Влияние ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему собак

При изучении влияния ЛХС-1208 на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы собак установлено, что препарат при ежедневном 15-кратном внутривенном введении в суммарной дозе 20 мг/кг не вызывал, а в суммарной дозе 30 мг/кг вызывал изменения ЭКГ животных. Выявлено увеличение показателей временных интервалов сердечных сокращений при сравнении с фоновыми показателями после введения ЛХС-1208 (табл. 2). У собаки, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг, на 3-и сутки наблюдения увеличивался интервал QRS (см. табл. 2). Во всех изученных дозах на ЭКГ собак были выявлены незначительные изменения (в пределах

Таблица 2. Показатели электрокардиограммы у собак после ежедневного внутривенного введения препарата ЛХС-1208 в течение 15 дней

Суммарная доза, мг/кг	Номер собаки	Пол	Сутки опыта								
			фон 1	фон 2	3-и	7-е	14-е	21-е	30-е	45-е	60-е
ЧСС, уд./мин											
20	1	♂	163	135	122	167	176	140	133	135	136
20	2*	♀	176	136	118	—	—	—	—	—	—
30	3*	♀	111	116	113	—	—	—	—	—	—
30	4	♀	97	102	91	95	106	107	100	105	101
RR, c											
20	1	♂	0,37	044	0,49	0,36	0,34	0,43	0,45	0,45	0,44
20	2*	♀	0,34	0,44	0,51	—	—	—	—	—	—
30	3*	♀	0,54	0,52	0,53	—	—	—	—	—	—
30	4	♀	0,62	0,59	0,56	0,63	0,57	0,59	0,60	0,57	0,60
PQ, c											
20	1	♂	0,10	0,12	0,12	0,12	0,14	0,14	0,12	0,12	0,12
20	2*	♀	0,12	0,12	0,12	—	—	—	—	—	—
30	3*	♀	0,11	0,12	0,14	—	—	—	—	—	—
30	4	♀	0,12	0,12	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
QT, c											
20	1	♂	0,18	0,22	0,20	0,20	0,24	0,20	0,20	0,22	0,23
20	2*	♀	0,16	0,20	0,22	—	—	—	—	—	—
30	3*	♀	0,18	0,20	0,20	—	—	—	—	—	—
30	4	♀	0,22	0,22	0,24	0,22	0,24	0,22	0,24	0,24	0,24
QRS, c											
20	1	♂	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04
20	2*	♀	0,02	0,02	0,03	—	—	—	—	—	—
30	3*	♀	0,04	0,04	0,06	—	—	—	—	—	—
30	4	♀	0,04	0,03	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05

Примечание. ЧСС — частота сердечных сокращений. *Собака выведена из эксперимента на 3-и сутки после окончания введения препарата.

физиологической нормы) — увеличение интервалов PQ и интервалов QT (см. табл. 2).

У собаки № 1, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 20 мг/кг, выявлены увеличение активности ЛДГ на 21-е и 45-е сутки наблюдения в 3,9 и 1,8 раза соответственно и увеличение активности ферментов АСТ на 21-е сутки в 1,5 раза по сравнению с фоновыми показателями (табл. 3).

У собаки № 2, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 20 мг/кг, изменений интервалов на ЭКГ и изменений биомаркеров не выявлено. На 3-и и 60-е сутки после применения препарата в сердце собак № 1 и № 2 при макроскопическом и гистологиче-

ском исследовании структура сердца не нарушена — эндокард, миокард, эпикард, перикард не повреждены, кардиомиоциты без изменений (рис. 4).

У собаки № 3, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг, на 3-и сутки наблюдения увеличивались интервал QRS (см. табл. 2) и показатель активности ЛДГ в 2,2 раза (см. табл. 3). У собак № 3 и № 4, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг, в сердце макроскопические изменения также не были выявлены. При гистологическом исследовании на 3-и сутки наблюдения у собаки № 3 в миокарде левого желудочка обнаружены очаговые изменения — отдельные кардиомиоциты или их

Таблица 3. Биохимические показатели активности ферментов в сыворотке крови собак после ежедневного внутривенного введения ЛХС-1208 в течение 15 дней

Номер собаки	Пол	Показатель	Сутки опыта								
			фон 1	фон 2	3-и	7-е	14-е	21-е	30-е	45-е	60-е
1	♂	ЛДГ, Е/л 50–495	64,0	80	103	80	121	313	120	146	95
2*	♀		76	182	191	—	—	—	—	—	—
3*	♀		107	167	369	—	—	—	—	—	—
4	♀		49	88	125	147	156	200	93	123	92
1	♂	АСТ, Е/л 10–55	23,2	16,1	27,1	24,9	25,0	35,7	26,7	30,2	24,0
2*	♀		29,2	26,2	33,2	—	—	—	—	—	—
3*	♀		33,0	21,1	33,6	—	—	—	—	—	—
4	♀		24,9	19,0	24,7	34,0	27,1	38,6	25,9	28,3	22,8

Примечание. ЛДГ — лактатдегидрогеназа; АСТ — аспартатаминотрансфераза. *Собака выведена из эксперимента на 3-и сутки после окончания введения препарата.

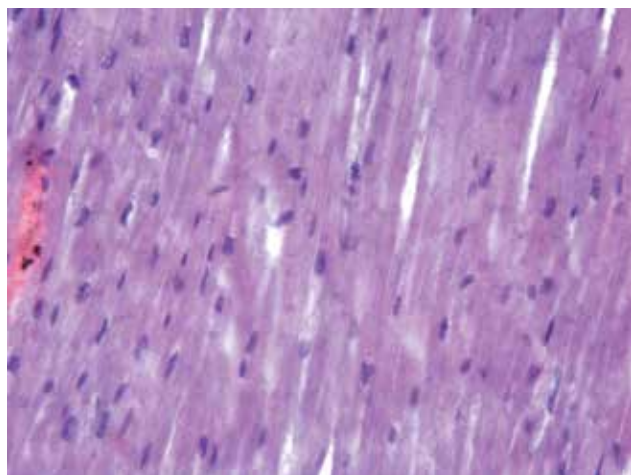


Рис. 4. Сердце (миокард) собаки № 1, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 20 мг/кг, 60-е сутки наблюдения. Структура мышечных волокон не нарушена. Окраска: гематоксилин и эозин, × 400

группы с признаками набухания (дистрофии) и гиперэозинофилии (гипоксии). Кроме того, обнаружен инфильтрат, состоящий из лимфоцитов, макрофагов, плазматических клеток и сегментоядерных лейкоцитов. Вблизи инфильтрата выявляются кардиомиоциты с дистрофическими и некробиотическими изменениями. Морфологическая картина соответствует очаговому (межуточному) миокардиту (рис. 5а).

У собаки № 4, получившей препарат в суммарной дозе 30 мг/кг, выявлены качественные изменения ЭКГ: на 7-е сутки наблюдения отмечена инверсия зубца Т и появление глубокого зубца Q, выявленные в I, II стандартных и AVL-отведениях. Отмечено увеличение активности ЛДГ с 3-х по 21-е и на 45-е сутки наблюдения в 1,4–2,3 раза и увеличение активности АСТ на 3-и и 21-е сутки наблюдения

в 1,4 и 1,6 раза по сравнению с фоновыми показателями (см. табл. 3). Морфологически на 60-е сутки наблюдения в стенке миокарда левого желудочка обнаружены отдельные участки гиперэозинофильных кардиомиоцитов с признаками дистрофических изменений (рис. 5б).

Для обобщения и анализа данных проявлений кардиотоксичности, полученных на крысах и собаках, сравнивали эквивалентные по токсичности дозы. При доклиническом токсикологическом исследовании дозы, изученные в хроническом эксперименте на крысах и собаках, охарактеризованы следующим образом: суммарные дозы 50 мг/кг для крыс и 20 мг/кг для собак — как низкие токсические дозы (НТД); суммарные дозы 200 мг/кг для крыс и 30 мг/кг для собак — высокие токсические дозы (ВТД). Суммарная доза для крыс 100 мг/кг охарактеризована как токсическая доза (ТД). При пересчете с мышшиной эффективной терапевтической дозы (25 мг/кг) с использованием видового коэффициента суммарная НТД для крыс превышена в 4 раза, а для собак — в 6 раз [18, 19].

Таким образом, после введения ЛХС-1208 собакам в обеих исследуемых дозах на все сроки наблюдения отмечен синусовый ритм, не отмечено нарушения сердечного ритма, связанного с электрической проводимостью. У 40 % крыс после введения ЛХС-1208 в дозе 50 мг/кг (НТД) на все сроки наблюдения и у 20 % контрольных крыс на 14-е и 30-е сутки наблюдения выявлено нарушение сердечного ритма, расцененное нами как следствие многократного эфирного наркоза. У крыс, получавших препарат в более высоких дозах — 100 (ТД) и 200 мг/кг (ВТД) — не было отмечено нарушения сердечного ритма. Данный факт позволяет предположить, что ЛХС-1208 в этих дозах обладает антиаритмическим действием.

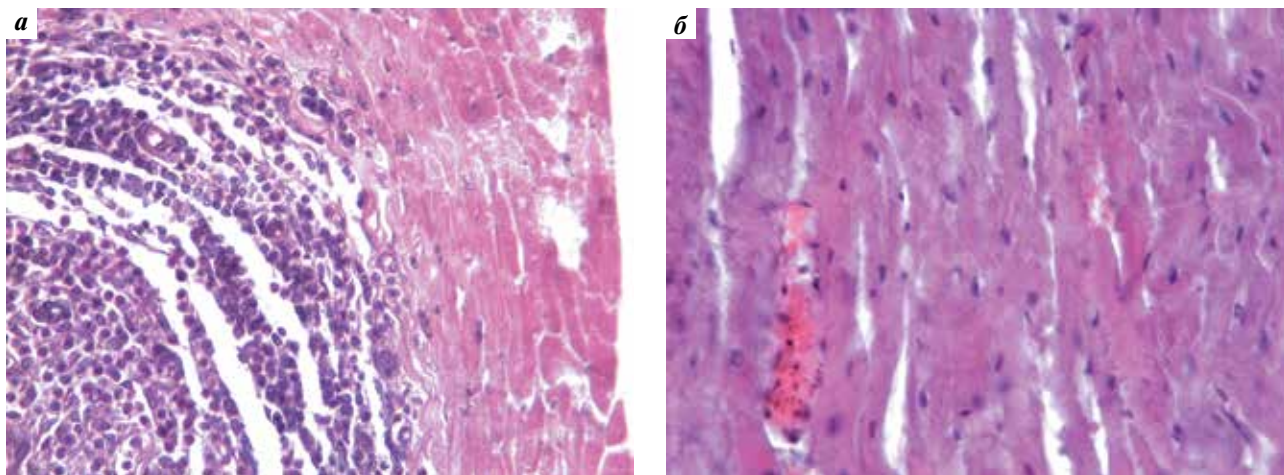


Рис. 5. Сердце (миокард) собак, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг: а – собака № 3, 3-и сутки наблюдения. Морфологическая картина очагового (межуточного) миокардита. Окраска: гематоксилин и эозин, $\times 400$; б – собака № 4, 60-е сутки наблюдения. Участок набухших, гиперэозинофильных кардиомиоцитов. Окраска: гематоксилин и эозин, $\times 400$

Во всех изученных дозах на ЭКГ собак были выявлены незначительные изменения (в пределах физиологической нормы) – увеличение интервалов PQ и интервалов QT. У крыс, получивших препарат в суммарных дозах 50 (НТД) и 200 мг/кг (ВТД), выявлены достоверное увеличение интервалов PQ на 30-е сутки наблюдения и увеличение интервалов QT у крыс, получивших препарат в суммарной дозе 100 мг/кг (ТД) на 3-и сутки наблюдения.

У собак, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 20 мг/кг (НТД), препарат вызывал увеличение активности ферментов ЛДГ на 21-е и 45-е сутки наблюдения в 3,9 в 1,8 раза (соответственно) и активности АСТ на 21-е сутки в 1,5 раза по сравнению с фоновыми показателями. У крыс после введения препарата во всех дозах не было выявлено увеличения активности ферментов ЛДГ и АСТ. Морфологических изменений в миокарде собак, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 20 мг/кг (НТД), и в миокарде крыс, получивших препарат в суммарной дозе 50 мг/кг (НТД), на всех сроках наблюдения не обнаружено.

У крыс, получивших препарат в суммарной дозе 100 мг/кг (ТД), на 3-и сутки обнаруживаются морфологические изменения: участки кардиомиоцитов с признаками дистрофии (набухание) и гиперэозинофилии (ишемии). На 30-е сутки у этих крыс морфологических изменений в миокарде не выявлено.

У 1 собаки, получившей препарат в суммарной дозе 30 мг/кг (ВТД), отмечены увеличение интервала QRS (на 3-и сутки наблюдения), инверсии зубца Т и появление глубокого зубца Q, выявленные в I, II стандартных и AVL отведениях (на 7-е сутки наблюдения), что является признаком кардиотоксичности. Препарат вызывал увеличение активности ЛДГ

у обеих собак, получивших ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг с 3-х по 21-е и на 45-е сутки наблюдения, в 1,4–2,3 раза и увеличение активности АСТ на 3-и и 21-е сутки в 1,4 и 1,6 раза у 1 собаки по сравнению с фоновыми показателями.

У собаки, получившей ЛХС-1208 в суммарной дозе 30 мг/кг (ВТД), на 3-и сутки наблюдения выявлена морфологическая картина очагового (межуточного) миокардита, а на 60-е сутки наблюдения у собаки в миокарде обнаружены участки гиперэозинофильных кардиомиоцитов с признаками дистрофических изменений.

У крыс, получивших препарат в суммарной дозе 200 мг/кг (ВТД), на 3-и сутки наблюдения в миокарде обнаруживаются морфологические изменения: участки кардиомиоцитов с признаками дистрофии (набухание) и гиперэозинофилии (ишемии). На 30-е сутки наблюдения сохраняются небольшие дистрофические изменения и гиперэозинофилия некоторых кардиомиоцитов. Отмеченные изменения могут считаться проявлением кардиотоксичности.

Заключение

Установлено, что новый российский противоопухолевый препарат ЛХС-1208, производное N-гликозида индокарбазола, обладает дозозависимым кардиотоксическим действием, вызывая функциональные изменения сердечно-сосудистой системы крыс во всех изученных дозах, а у собак только в максимальной введенной дозе препарата. Морфологически кардиотоксичность не подтверждена у животных, получивших минимальную исследуемую дозу препарата (НТД), а подтверждена только у животных, получивших максимальную дозу препарата (ВТД).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гершанович Л.Л. Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей. М.: Медицина, 1982. С. 89–97. [Gershanovich L. L. Complications of chemotherapy and hormone therapy of malignant tumors. Moscow: Meditsina, 1982. Pp. 89–97 (In Russ.).]
2. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой. 3-е изд., доп. и перераб. М.: Практическая медицина, 2011. С. 435–436. [Guide to chemotherapy of tumor diseases. Ed. N.I. Perevodchikova 3rd ed., updated and revised. Moscow: Prakticheskaya Meditsina, 2011. Pp. 435–436 (In Russ.).]
3. Энциклопедия по клинической онкологии: Руководство для практикующих врачей. М.И. Давыдов, Г.Л. Вышковский и др.; под общ. ред. М.И. Давыдова, Г.Л. Вышковского. М.: РЛС-2005, 2004. 1427 с. [Encyclopedia of Clinical Oncology: A Handbook for Practitioners. M.I. Davydov, G.L. Vyshkovsky et al.; Eds. M. I. Davydov, G.L. Vyshkovsky. Moscow: RLS-2005, 2004. 1427 p. (In Russ.).]
4. Тихонова Н.И., Ярцева И.В., Еремина В.А. и др. N-гликозиды индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, обладающие противоопухолевой активностью. Патент № 2548045 Российская Федерация, МПК C07N 19/04, A61P 35/00, A61K 31/7008. Опубл. 10.04.15, Бюл. № 10. 13 с. [Tikhonova N.I., Yartseva I.V., Eremina V.A. et al. N-glycosides indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles with antitumor activity/and others; the applicant and the patent holder Patent No. 2548045 Russian Federation, IPC C07N 19/04, A61P 35/00, A61K 31/7008. Publ. 10.04.15, Bul. № 10. 13 p. (In Russ.).]
5. Горюнова О.В., Апрышко Г.Н., Пугачева Р.Б. и др. Изучение противоопухолевой активности аминокислотных производных индоло[2,3а]карбазолов. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):74. [Goryunova O.V., Appleshko G.N., Pugacheva R.B. et al. Study of the antitumor activity of amino acid derivatives of indolo[2,3a]carbazoles. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):74 (In Russ.).]
6. Яворская Н.П., Голубева И.С., Еремина В.А. и др. Изучение противоопухолевой активности индоло[2,3а]карбазолов. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):149. [Yavorskaya N.P., Golubeva I.S., Eremina V.A. et al. Study of the antitumor activity of indolo[2,3a]carbazoles. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):149 (In Russ.).]
7. Киселева М.П., Борисова Л.М., Эктова Л.В. и др. Исследование противоопухолевой активности новых соединений в ряду производных гликозидов индолокарбазолов. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(15):35. [Kiseleva M.P., Borisova L.M., Ektova L.V. et al. Investigation of the antitumor activity of new compounds in a series of glycoside derivatives of indolocarbazoles. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(15):35 (In Russ.).]
8. Голубева И.С., Яворская Н.П., Еремина В.А. и др. Противоопухолевая активность гликозидов индолокарбазолов. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(15):23–24. [Golubeva I.S., Yavorskaya N.P., Eremina V.A. et al. Antitumor activity of glycosides of indolocarbazoles. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(15):23–24 (In Russ.).]
9. Ярцева И.В., Игнатъева Е.В., Дмитричева Н.А. и др. Стандартизация ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):126–7. [Yartseva I.V., Ignatieva E.V., Dmitricheva N.A. et al. Standardization of LHS-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(1):126–7 (In Russ.).]
10. Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазола – ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2014;12(3):25–32. [Lantsova A.V., Sanarova E.V., Oborotova N.A. et al. Development of the technology for the preparation of an injectable dosage form based on the domestic substance of an indolocarbazole derivative – LHS-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;12(3):25–32 (In Russ.).]
11. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликазида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение I. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(2):71–77. [Kiseleva M.P., Shprakh Z.S., Borisova L.M. et al. Preclinical study of the antitumor activity of the derivative of N-glycoside indolocarbazole LHS-1208. Message I. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(2):71–77 (In Russ.).]
12. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. Сообщение II. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(3):41–7. [Kiseleva M.P., Shprakh Z.S., Borisova L.M. et al. Preclinical study of the antitumor activity of the derivative of N-glycoside indolocarbazole LHS-1208. Communication II. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(3):41–7 (In Russ.).]
13. Киселева М.П., Шпрах З.С., Деженкова Л.Г. и др. Действие производного индолокарбазолов ЛХС-1208 на топоизомеразу I. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):89. [Kiseleva M.P., Shprakh Z.S., Dezhenkova L.G. et al. The effect of the derivative of indolocarbazoles LHS-1208 on topoisomerase I. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):89 (In Russ.).]
14. Киселева М.П., Борисова Л.М., Шпрах З.С. и др. Антиметастатическое действие производного индолокарбазолов ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):90. [Kiseleva M.P., Borisova L.M., Shprakh Z.S. et al. Antimetastatic action of the derivative of indolocarbazoles LHS-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):90 (In Russ.).]
15. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного индолокарбазола ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):129. [Smirnova Z.S., Borisova L.M., Kiseleva M.P. et al. Preclinical study of the antitumor activity of the derivative of indolocarbazole LHS-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(1):129 (In Russ.).]

16. Вартанян А.А., Барышников М.А., Бурова О.С. и др. Блокатор васкулогенной мимикрии восстанавливает чувствительность резистентных клеток меланомы к ДНК-алкилирующим агентам. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2016;27(2):164–71. [Vartanyan A.A., Baryshnikova M.A., Burova O.S. et al. The blocker of vasculogenic mimicry restores the sensitivity of resistant melanoma cells to DNA alkylating agents. Vestnik RONC im. N.N. Blokhina = Journal of N.N. Blokhin Russian cancer research center 2016;27(2):164–71 (In Russ.)].
17. Николина А.А., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И. и др. Изучение «острой» токсичности нового противоопухолевого лекарственного средства – на основе производного индолокарбазола ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(4):59–64. [Nikolina A.A., Kulbachevskaya N.Yu., Konyaeva O.I. et al. The study of the “acute” toxicity of a new antitumor drug – based on the derivative of indolocarbazole LHC-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(4):59–64 (In Russ.)].
18. Николина А.А., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И. и др. Изучение субхронической токсичности нового противоопухолевого лекарственного средства – гликозидного производного индолокарбазола ЛХС-1208 на крысах. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(3):62–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-62-69. [Nikolina A.A., Kulbachevskaya N.Yu., Konyaeva O.I. et al. A study of the subchronic toxicity of a new antitumor drug, a glycoside derivative of indolocarbazole LHC-1208 in rats. Russian Biotherapeutic Journal 2016;15(3):62–9 (In Russ.)].
19. Николина А.А., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И. и др. Доклиническое изучение токсичности нового противоопухолевого лекарственного средства – гликозидного производного индолокарбазола ЛХС-1208. Успехи молекулярной онкологии 2016;3(3):88. [Nikolina A.A., Kulbachevskaya N.Yu., Konyaeva O.I. et al. A preclinical study of the toxicity of a new antitumor drug, the glycoside derivative of indolocarbazole LHC-1208, has been made. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = The successes of molecular oncology 2016;3(3):88 (In Russ.)].
20. Ермакова Н.П., Кульбачевская Н.Ю., Меркулова И. Б и др. Влияние ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему крыс. Сборник тезисов Сеченовского Международного Саммита 2017:59–60. [Ermakova N.P., Kulbachevskaya N.Yu., Merkulova I.B. et al. The influence of LHC-1208 on the cardiovascular system of rats. Theses of the Sechenov International Summit 2017:59–60 (In Russ.)].
21. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. «Субхроническая» токсичность лекарственного средства на основе производного индолокарбазола на крысах. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):99. [Kulbachevskaya N.Yu., Konyaeva O.I., Ermakova N.P. et al. “Subchronic” toxicity of a drug based on an indolocarbazole derivative in rats. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):99 (In Russ.)].
22. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. «Острая» токсичность лекарственного средства на основе производного индолокарбазола (ЛХС-1208) на мелких лабораторных животных. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):100. [Kulbachevskaya N.Yu., Konyaeva O.I., Ermakova N.P. et al. “Acute” toxicity of a drug based on an indolocarbazole derivative (LHC-1208) on small laboratory animals. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):100 (In Russ.)].
23. Николина А.А., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И. и др. Субхроническая токсичность лекарственного средства на основе гликозидного производного индолокарбазола на собаках. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):77. [Nikolina A.A., Kulbachevskaya N.Yu., Konyaeva O.I. et al. Subchronic toxicity of the drug based on the glycoside derivative of indolocarbazole on dogs. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(1):77 (In Russ.)].
24. Принципы надлежащей лабораторной практики. Национальный стандарт Российской Федерации (ГОСТ 53434–2009). М.: Стандартинформ, 2010. [Principles of Good Laboratory Practice. National Standard of the Russian Federation (GOST 53434–2009). Moscow: Standartinform, 2010. (In Russ.)].
25. Об утверждении Правил лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Минздравсоцразвития России) от 1 апреля 2016 г. N 199н. [On approval of the Rules of Laboratory Practice. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation (Ministry of Health and Social Development of Russia) from 01 April 2016 No. 199n (In Russ.)].
26. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002:1–53. [Bolshakov O.P., Neznanov N.G., Babakhanyan R.V. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and laboratory animals. Kachestvennaya klinicheskaya praktika = Qualitative clinical practice 2002:1–53 (In Russ.)].
27. Методические указания по изучению общетоксического действия лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. д. м. н. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Methodical instructions for studying the general toxic effects of drugs. In: Handbook on preclinical drug research. General ed. by Ph.D. A. N. Mironov. Moscow: Grif i K, 2012. 944 p. (In Russ.)].
28. Михайлова Л.М., Сыркин А.Б., Гарин А.М. и др. Методические указания по изучению общетоксического действия противоопухолевых фармакологических средств. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общ. ред. чл.-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. 832 с. С. 170–204. [Mikhailova L.M., Syrkin A.B., Garin A.M. et al. Methodical instructions for studying the general toxic effect of antitumor pharmacological agents. In: Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Gen. ed. by Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Sciences prof. R.U. Khabriev. 2nd ed., updated and revised. Moscow: Meditsina, 2005. 832 p. Pp. 170–204 (In Russ.)].
29. Илларионова В.К., Ипполитова Т.В., Денисенко В.Н. Основы электрокардиографии у собак. Учебное пособие. М.: Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, 2004. [Illarionova V.K., Ippolitova T.V., Denisenko V.N. Fundamentals of electrocardiography in dogs. Tutorial. Moscow: K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 2004 (In Russ.)].
30. Мурашко В.В., Струтынский А.В. Электрокардиография. Учебное пособие. 3-е изд., перераб. и доп. М.: МЕДпресс-информ, 1999.

- [Murashko V.V., Strutynskiy A.V. Electrocardiography: a textbook. 3rd ed., updated and revised. Moscow: MEDPress-inform 1999 (In Russ.)].
31. Ниманд Х.Н., Сутер П.Ф. Болезни собак. Практическое руководство ветеринарных врачей. М.: Аквариум, 1998. [Nimand H.N., Suter P.F. Diseases of dogs. Practical guidance of veterinarians. Moscow: Aquarium, 1998 (In Russ.)].
32. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1982. [Volkova O.V., Eletskiy Yu.K. Fundamentals of histology with histological technique. 2nd ed., updated and revised. Moscow: Meditsina, 1982 (In Russ.)].
33. Грицевская И.Л. Изменения миокарда белых крыс при воздействии пестицида «Кронетон». В сб.: Морфологические методы исследования в гигиене и токсикологии. Сборник науч. тр. М.: Медицина, 1983. С. 11–14. [Gritsevskaya I.L. Changes in the myocardium of white rats under the influence of the pesticide “Croneton”. In: Morphological methods of research in hygiene and toxicology. Coll. of Scientific Works. Moscow: Meditsina, 1983. Pp. 11–14 (In Russ.)].

ORCID авторов / ORCID of authors

В.М. Бухман / V.M. Bukhman: <https://orcid.org/0000-0002-7062-798X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.