

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ОЛИВАМИДА В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРОЛИКАХ

Э.Р. Переверзева, М.И. Трещалин, В.А. Голибродо, А.Н. Тевяшова, И.Д. Трещалин

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»;
Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1

Контакты: Михаил Иванович Трещалин funky@beatween.ru

Введение. Антибиотики группы ауреоловой кислоты — высокоактивные противоопухолевые препараты. Новые данные о механизме их действия обусловили необходимость создания аналогов с улучшенными фармакологическими свойствами. В ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе» были разработаны методы селективной химической модификации антибиотика группы ауреоловой кислоты оливомицина А, получен ряд полусинтетических производных. Наиболее активное соединение — N, N-диметиламиноэтиламид 1'-дез-(2,3-дигидроксипутироил)-1'-карбокси-оливомицина А (оливамид) — было отобрано для углубленного доклинического изучения.

Цель исследования — доклиническое изучение токсикологической безопасности лекарственной формы препарата оливамид в хроническом эксперименте на кроликах.

Материалы и методы. Исследование проведено на кроликах «Советская шиншилла». Препарат в лекарственной форме вводили внутривенно ежедневно в течение 15 дней в дозах, суммарно составляющих максимально переносимую и дозу, вызывающую гибель 50 % животных (LD_{50}) — (разовые дозы 0,02 и 0,04 мг/кг соответственно). В ходе исследования определяли массу тела, проводили клинический и биохимический анализ крови, анализ мочи, снимали электрокардиограмму. На 1-е и 30-е сутки по окончании курса животных подвергали этаназии. Проводили патоморфологическое исследование внутренних органов.

Результаты. Показано, что введение оливамида в дозе, суммарно составляющей максимально переносимую дозу, приводит к повышению активности аспаратаминотрансферазы, увеличению содержания мочевины и креатинина. При анализе мочи было отмечено появление белка, уробилиногена и увеличение удельного веса. При применении оливамида в дозе, суммарно составляющей LD_{50} , помимо отмеченных выше показателей, было выявлено повышение активности щелочной фосфатазы и уровня общего билирубина. При патоморфологическом исследовании были найдены повреждения структуры печени и почек, интенсивность которых зависела от дозы препарата.

Заключение. Выявленные токсические свойства оливамида зависят от величины примененной дозы. При курсовом применении препарата в дозе, суммарно составляющей максимально переносимую дозу, они практически полностью обратимы в течение 30 дней.

Ключевые слова: оливамид, оливомицин А, ауреоловая кислота, хроническая токсичность, кролики

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-91-97

TOXICOLOGICAL STUDY OF OLIVAMIDE IN CHRONIC EXPERIMENT ON RABBITS

E.R. Pereverzeva, M.I. Treschalin, V.A. Golibrodo, A.N. Tevyashova, I.D. Treschalin

Gause Institute of new antibiotics; 1 bldg, 11 B. Pirogovskaya St., Moscow 119021, Russia

Introduction. Antibiotics of aureolic acid group are highly effective anticancer drugs. New data about their mode of action caused the need for creation of analogs with improved pharmacological properties. The methods of selective chemical modification of aureolic acid antibiotic olivomycin A were developed at the Gause Institute of New Antibiotics. Some semisynthetic derivatives have been prepared. The most active compound — N, N-dimethylaminoethylamide 1'-des-(2,3-dihydroxybutyryl)-1'-carboxy-olivomycin A (olivamide) — was selected for advanced preclinical testing.

Objective. The aim of the study was to investigate the toxicological safety of olivamide drug formulation in chronic experiment on rabbits.

Materials and methods. The study was performed in male and female “Soviet chinchilla” rabbits. Drug formulation was administered intravenously at the total doses of maximum tolerated dose and 50 % lethal dose (15×0.02 mg/kg or 15×0.04 mg/kg with 24-h interval). During the experiment body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography and urinalysis were performed. Animals were sacrificed 1 and 30 days post treatment. The internal organs were subjected to histological evaluation.

Results. It has been shown that the treatment with total dose of olivamide maximum tolerated dose produces an increase of aspartate aminotransferase, urea and creatinine level in serum. Urinalysis revealed the elevation of protein, urobilinogen and urine specific gravity. Administration of high dose of olivamide in addition to the above-mentioned laboratory parameter caused the raising of alkaline phosphatase and total bilirubin level in serum. Microscopic pathology observation showed structure abnormalities of varying severity in liver and kidneys.

Conclusion. *Olivamide drug formulation displayed dose-dependent toxic properties. Multiple administration of low dose of the drug produces transient toxic effects completely reversible within 30 days.*

Key words: *olivamide, olivomycin, aureolic acid, chronic toxicity, rabbits*

Введение

Среди первых представителей противоопухолевых антибиотиков, вошедших в клиническую практику в 60–70-х годах прошлого столетия, были антибиотики группы ауреоловой кислоты (АК): оливомидин А (ОА), хромомицин (ХМ) и митрамицин (М). Препараты очень близки по структуре. ХМ и М имеют одинаковый хромофор хромомицинон, но отличаются сахарными остатками. Хромофор ОА оливин не имеет метильной группы в положении 7 хромомицинона [1]. В клинике ОА был эффективен при лечении опухолей яичка (тератобластома, эмбриональный рак), хорионэпителиомы матки, злокачественных опухолей миндалин. В комбинации с другими препаратами его использовали для лечения некоторых форм сарком мягких тканей. М применяли при лечении эмбрионального рака яичка. Во время клинических испытаний ХМ наблюдали случаи объективного эффекта при раке желудка, толстой кишки, костных и мягкотканых саркомах [2]. Несмотря на близость строения, эти препараты отличались не только по спектру действия, но и по токсичности. ОА наименее токсичен и имеет наилучший терапевтический индекс. ХМ оказался наиболее токсичным из 3 антибиотиков. При клинических испытаниях почти у всех больных наблюдали развитие почечной недостаточности, вплоть до острого некроза канальцев. Одним из самых тяжелых проявлений побочного действия М в клинике оказался геморрагический диатез, сопровождающийся тромбоцитопенией [3]. Эти препараты применялись довольно широко, однако позже были признаны недостаточно эффективными, слишком токсичными, и их перестали использовать для лечения больных со злокачественными опухолями.

Интерес к антибиотикам группы АК возродился в 2000-х годах. Он был обусловлен появлением новых данных о механизме их действия. Так, было показано, что в основе противоопухолевого эффекта антибиотиков этой группы лежит ингибирование процессов репликации и транскрипции посредством взаимодействия с GC-богатыми нуклеотидными последовательностями в присутствии ионов Mg^{2+} , в частности с сайтом транскрипционного фактора Sp1, расположенным в этом регионе [4]. Белок Sp1, влияющий на клеточный рост, дифференциацию и апоптоз, играет критическую роль в пролиферации клеток и метастазировании различных видов опухолей [5]. Кроме того, было установлено, что антибиотики

группы АК предотвращают развитие резистентности опухолевых клеток к другим противоопухолевым средствам, в том числе по механизму, связанному с ингибированием транскрипции гена *MDR1*, гиперэкспрессия которого обеспечивает феномен множественной лекарственной устойчивости [6, 7].

Появление новых технологических подходов, таких как комбинаторный биосинтез, биокатализ, генная инженерия, позволило получить аналоги природных структур с улучшенными химиотерапевтическими свойствами [8]. Однако такой эффективный способ получения новых препаратов, как химическая модификация природных соединений, для антибиотиков группы АК ранее практически не применялся [9]. В ФГБНУ «НИИНА» были изучены различные направления химической модификации ОА как наиболее перспективного цитотоксического вещества, обладающего наилучшим химиотерапевтическим индексом среди антибиотиков группы АК, мощного индуктора апоптоза опухолевых клеток и ингибитора P53-индуцированной транскрипции [10]. Были получены серии полусинтетических производных, ряд из которых показал преимущества перед исходным антибиотиком [11, 12]. Соединение N, N-диметиламиноэтилаид 1'-дез-(2,3-дигидроксибутирил)-1'-карбокси-оливомидин А (оливамид) было отобрано для углубленного доклинического изучения.

Материалы и методы

Работа выполнена в соответствии с правилами экспериментального изучения оригинальных фармакологических веществ [13] с соблюдением этических норм обращения с животными, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [14].

Исследования проведены на кроликах породы Советская шиншилла, самцах и самках массой 2500–2800 г, полученных из питомника «Белый мох». Животные были разделены на 6 групп (3 группы самцов и 3 группы самок) по 6 особей. В качестве суммарных доз были выбраны максимально переносимая доза (МПД) – 0,28 мг/кг доза, вызывающая гибель 50 % животных (LD_{50}), – 0,63 мг/кг, которые были рассчитаны для кроликов путем пересчета с соответствующих доз для крыс с учетом коэффициента поверхности тела [15] и коэффициента кумуляции оливамида. Препарат в лекарственной форме вводили внутривенно в краевую вену уха ежедневно в течение 15 сут.

Разовые суточные дозы составили соответственно 0,02 и 0,04 мг/кг. Наблюдение продолжали в течение 30 сут после прекращения введений препарата.

На протяжении исследования ежедневно проводили оценку состояния и поведения животных, 1 раз в неделю определяли массу тела. Гематологическое исследование периферической крови (лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоформула и гематокрит) проводили перед началом курса введений (0 сутки), на 1, 7 и 15-й дни во время курса, на 3, 5, 7-е; 10, 20 и 30-е сутки после окончания курса введений с помощью автоматического гематологического анализатора «Abacus Junior Vet» (Diatron, Австрия). Биохимическое исследование сыворотки крови животных с определением аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), креатинина, мочевины, билирубина прямого и общего, общего белка, альбумина, глюкозы осуществляли на 1-й и 30-й день после окончания курса введений препарата при помощи автоматического биохимического анализатора «ChemWell» (Awareness Technology Inc., США). Общий анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тельца, белок, уробилиноген, удельный вес) проводили на 1-й и 30-й день после окончания введений препарата, используя автоматический анализатор мочи «Laura Smart» (Erba Lachema, Чехия). ЭКГ во 2-м стандартном отведении снимали на 1-е и 30-е сутки после курса (электрокардиограф ЭК1Т-07, «Аксион», Россия).

Статистическую обработку количественных данных проводили по критерию *t* Фишера–Стьюдента при помощи компьютерных программ StatPlus 2006 и Microsoft Excel. Различия определяли как достоверные при $p \leq 0,05$.

На 1-е и 30-е сутки по окончании курса введений препарата половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии, определяли массовые коэффициенты тимуса, сердца, печени, почек, селезенки. Участки внутренних органов фиксировали в 10 % нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин. Короткие серии срезов окрашивали гематоксилином и эозином и подвергали световой микроскопии.

Результаты и обсуждение

На протяжении всего эксперимента гибели животных не наблюдалось. Значимых отклонений от контрольных значений показателей периферической крови не выявлено. Отклонений в поведенческих реакциях животных не отмечено.

При биохимическом исследовании сыворотки крови и у самцов, и у самок на 1-е сутки после окончания введений оливамида в низкой дозе было зарегистрировано повышение активности АСТ (рис. 1–2),

содержания креатинина (рис. 3–4) и мочевины (рис. 5–6). К концу наблюдения значения этих показателей не отличались от контроля. При применении препарата в высокой дозе наряду с отмеченными выше изменениями происходило повышение активности ЩФ (рис. 7–8) и уровня общего билирубина (рис. 9–10). При этом повышенный уровень АСТ и мочевины сохранялся до 30 сут после окончания курса введений.

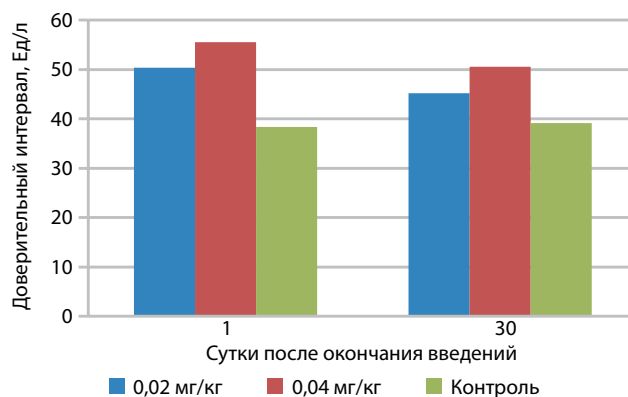


Рис. 1. Динамика изменения уровня АСТ в сыворотке крови самцов кроликов

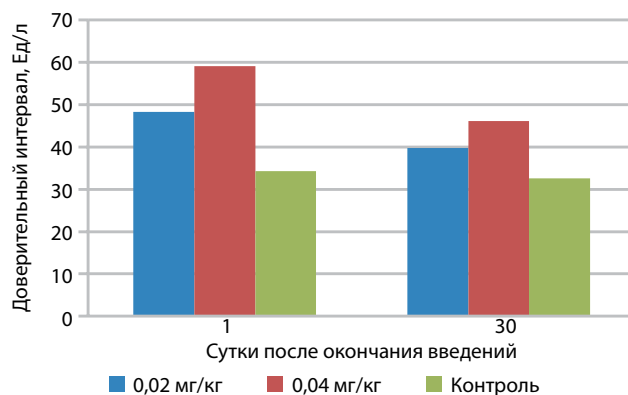


Рис. 2. Динамика изменения уровня АСТ в сыворотке крови самок кроликов

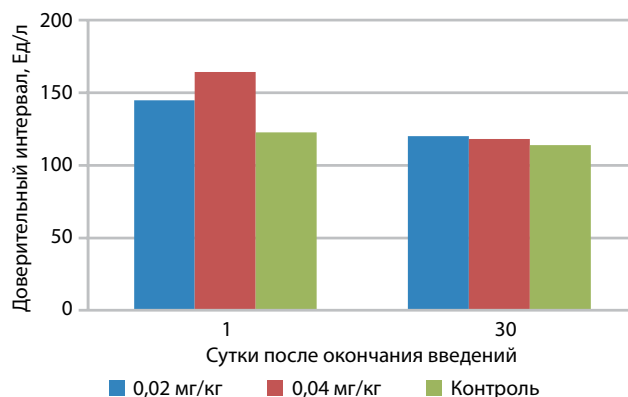


Рис. 3. Динамика изменения уровня креатинина в сыворотке крови самцов кроликов

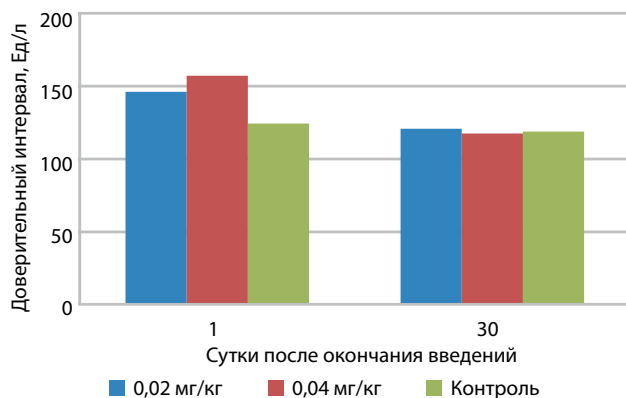


Рис. 4. Динамика изменения уровня креатинина в сыворотке крови самок кроликов

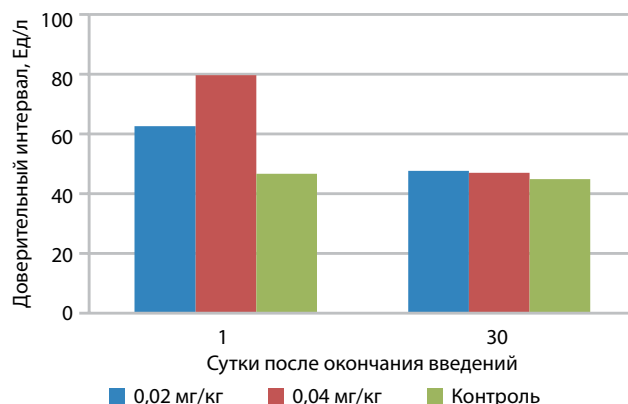


Рис. 7. Динамика изменения уровня ЩФ в сыворотке крови самцов кроликов

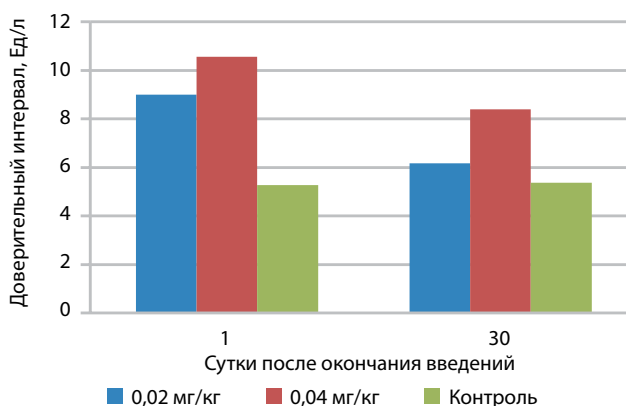


Рис. 5. Динамика изменения уровня мочевины в сыворотке крови самцов кроликов

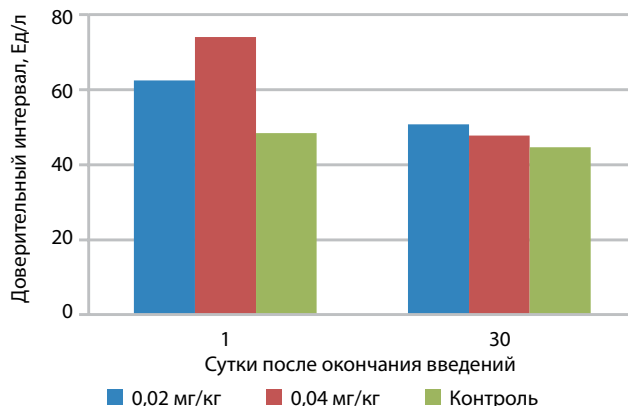


Рис. 8. Динамика изменения уровня ЩФ в сыворотке крови самок кроликов

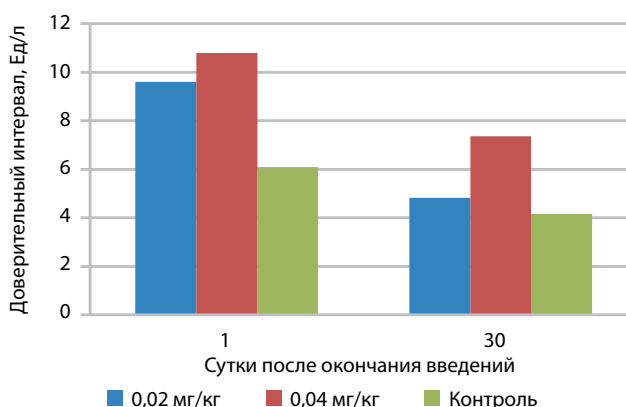


Рис. 6. Динамика изменения уровня мочевины в сыворотке крови самцов кроликов

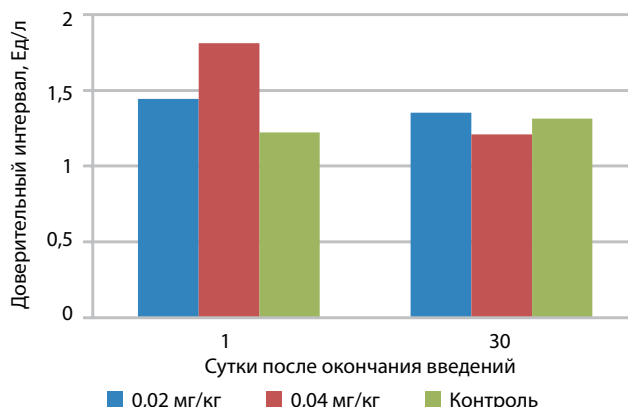


Рис. 9. Динамика изменения уровня общего билирубина в сыворотке крови самцов кроликов

При исследовании состава мочи на 1-е сутки после окончания курса введений препарата в обеих изученных дозах как у самцов, так и у самок отмечено появление белка и уробилиногена, увеличение удельного веса. На 30-е сутки после отмены препарата у кроликов, получавших оливами́д в высокой

дозе, сохранялось повышенное содержание уробилиногена. Содержание белка в моче и удельный вес не отличались от контроля.

Патоморфологическое исследование показало, что при ежедневном внутривенном введении в течение 15 дней в обеих изученных дозах оливами́д ока-

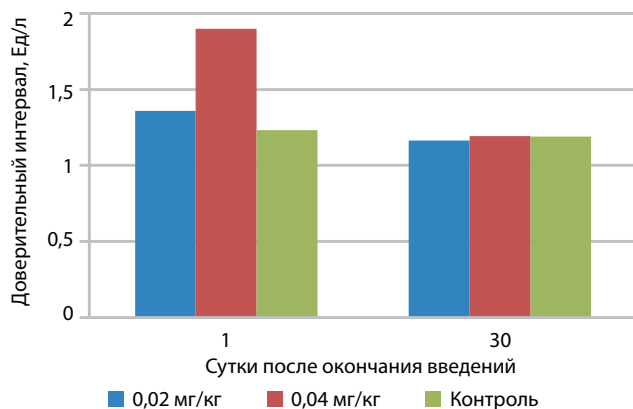


Рис. 10. Динамика изменения уровня общего билирубина в сыворотке крови самок кроликов

зывает повреждающее действие на структуру печени и почек кроликов, которое выражается как в дистрофических, так и в деструктивных изменениях клеток паренхимы органов. В печени преобладали явления вакуольной дистрофии, в почках — некротические

процессы. Характер морфологических изменений не зависел от пола животных.

При применении препарата в высокой дозе вакуольная дистрофия гепатоцитов носила тотальный характер (рис. 11а, б). Вокруг некоторых триад был выявлен некроз гепатоцитов (рис. 11в). В течение месяца структура печени частично восстанавливалась, очаги некроза подвергались организации (рис. 11г). При использовании оливамида в дозе, суммарно составляющей МПД, небольшие очаги вакуольной дистрофии возникали только вблизи центральных вен, а к концу наблюдения структура органа не отличалась от контроля.

Применение препарата в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀, приводило к изменению структуры как канальцев, так и клубочков почки. На 1-е сутки после курса введений препарата во всех зонах почки были найдены очаги вакуольной дистрофии и деструкции эпителия извитых и прямых канальцев. В корковой и мозговой зоне были выявлены «лапчатые» клубочки, иногда с резко утолщенной капсулой

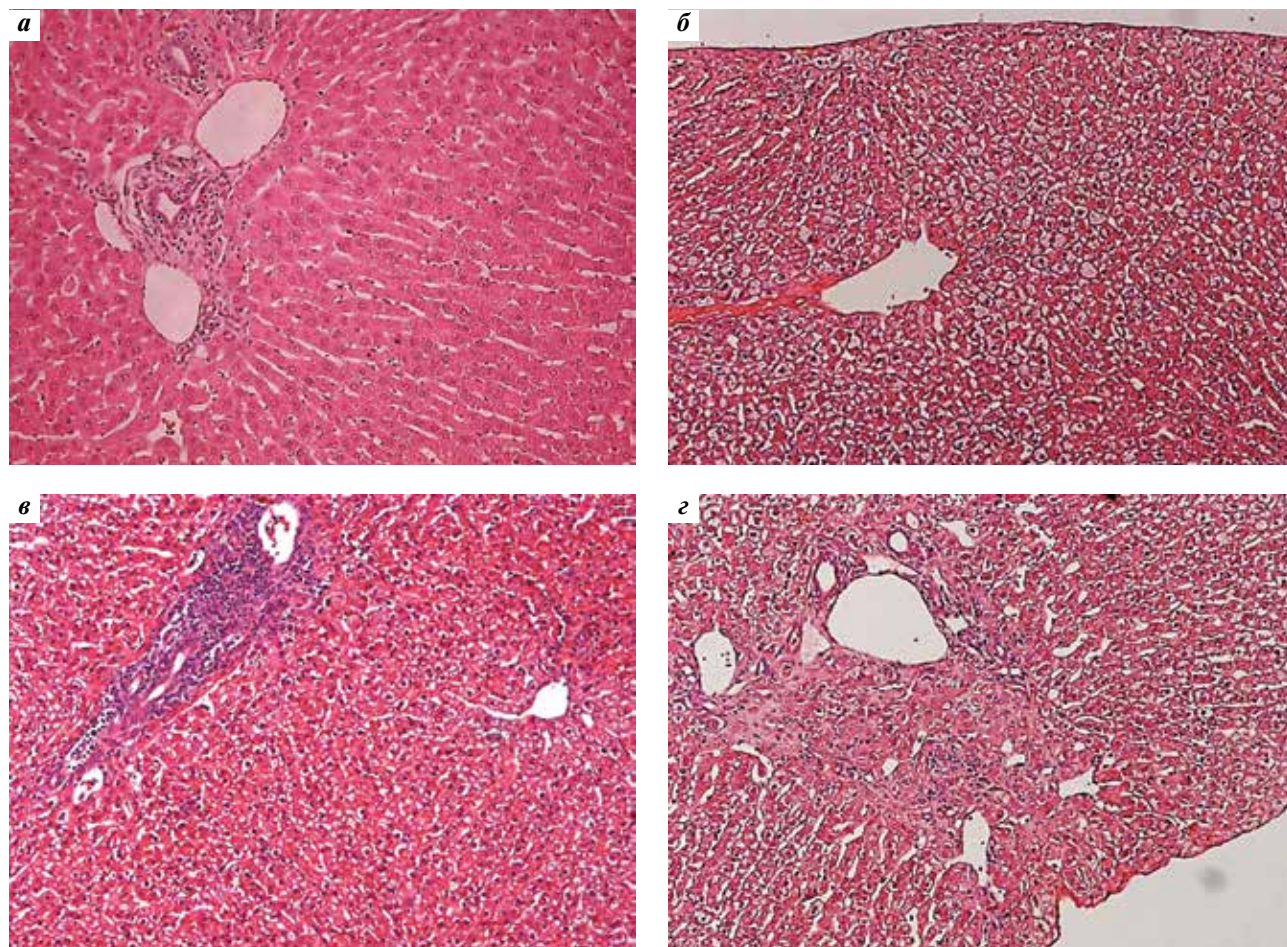


Рис. 11. Патоморфологическое исследование печени кролика. $\times 20$: а — интактный контроль, триада; б — оливамида, 0,04 мг/кг $\times 15$, 1-е сутки после курса. Вакуольная дистрофия гепатоцитов; в — оливамида, 0,04 мг/кг $\times 15$, 1-е сутки после курса. Некроз гепатоцитов вокруг триады; г — оливамида, 0,04 мг/кг $\times 15$, 30-е сутки после курса. Очаг некроза гепатоцитов вокруг триады в стадии организации

(рис. 12а, б). Отдельные нефроны подвергались тотальному некрозу, который к 30-м суткам наблюдения завершался фиброзом капсулы клубочков, склерозом очагов некроза и формированием кист на месте деструкции канальцев (рис. 12в, г).

При применении препарата в низкой дозе изменения в ткани почки возникали не у всех животных и носили мелкоочаговый характер, затрагивая небольшие группы извитых канальцев (рис. 12д). В течение 30 дней очаги некроза подвергались организации (рис. 12е).

В остальных органах и тканях патологических изменений не обнаружено.

Таким образом, в хроническом эксперименте на кроликах было установлено, что оливамида обладает гепато- и нефротоксическими свойствами. Гепатотоксичность препарата проявляется в виде повышения активности АЛТ, АСТ и уровня билирубина. Морфологически она выражается в развитии вакуольной дистрофии гепатоцитов и появлении очагов микронекроза. При применении препарата в дозе, суммарно составляющей МПД, изменения клинико-лабораторных показателей и структуры органа полностью обратимы в течение месяца.

Основной лимитирующий вид токсичности оливамида – нефротоксичность. Она проявляется в повышении уровня мочевины и креатинина в сыворотке крови, появлении уробилиногена и белка в моче и увеличении ее удельного веса.

Особенностью нефротоксического действия оливамида является его свойство повреждать структуру капилляров клубочков, вызывая фибропластический гломерулонефрит, который морфологически выражается в «лапчатости» клубочков и фиброзе их капсулы, и, как следствие, деструкцию канальцев. Очаговый, а иногда тотальный некроз отдельных нефронов, возникающий при применении препарата в высокой дозе, сопровождается повышением активности ЩФ в сыворотке крови. Некротические процессы завершаются формированием кист и склерозом поврежденных участков почки. При использовании препарата в низкой дозе повреждения структуры почки отмечаются лишь у отдельных животных и затрагивают отдельные клубочки и извитые канальцы. В течение 30 дней биохимические показатели сыворотки крови и состав мочи нормализуются, а очаги деструкции подвергаются организации.

Заключение

Оливамида не обладает гематотоксическими свойствами, не оказывает влияния сердечно-сосудистую и пищеварительную систему. Интенсивность изменений структуры и функции печени и почек кроликов, возникающих под действием препарата, зависит от величины примененной дозы. Это позволяет рекомендовать препарат для дальнейшего продвижения.

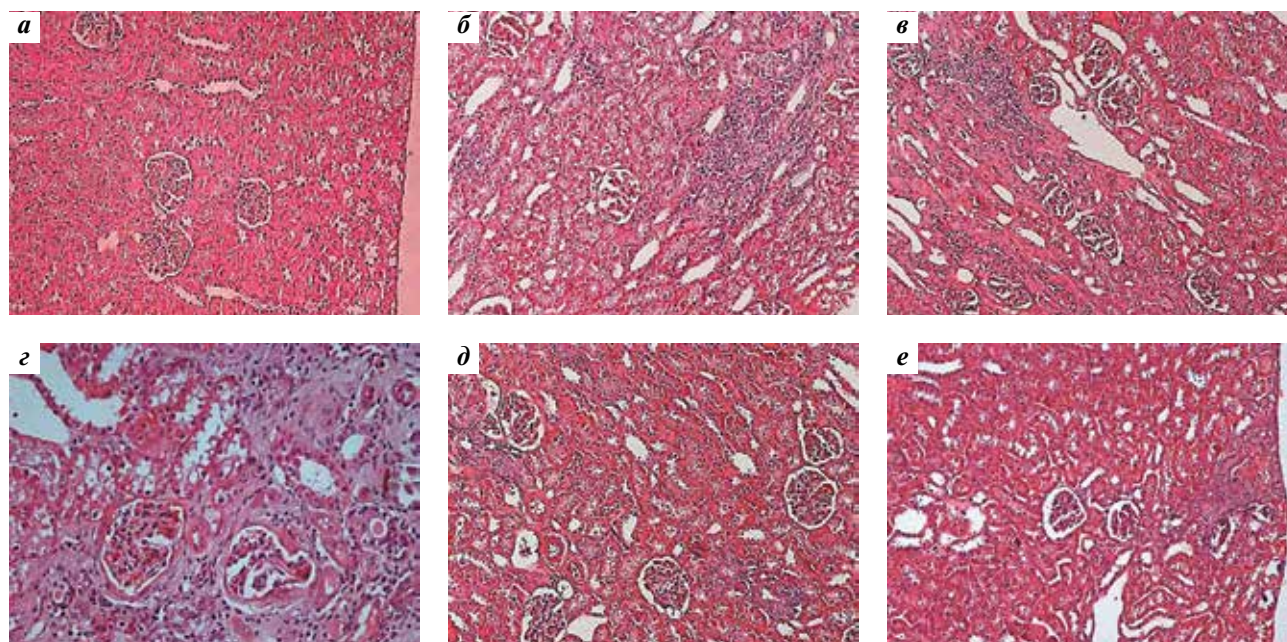


Рис. 12. Патоморфологическое исследование почки кролика. $\times 20$: а – интактный контроль; б – оливамида, 0,04 мг/кг $\times 15$, 1-е сутки после курса. Некроз, деструкция, вакуольная дистрофия эпителия извитых канальцев, кистообразное расширение просвета, «лапчатые» клубочки; в – оливамида, 0,04 мг/кг $\times 15$, 30-е сутки после курса. Склероз в области некроза канальцев, кисты, выстланные плоским эпителием; г – оливамида, 0,04 мг/кг $\times 15$, 30-е сутки после курса. Фиброз капсулы клубочков, $\times 40$; д – оливамида, 0,02 мг/кг $\times 15$, 1-е сутки после курса. Мелкие очаги вакуольной дистрофии и деструкции эпителия извитых канальцев; е – оливамида, 0,02 мг/кг $\times 15$, 30-е сутки после курса. Очаг некроза в стадии организации

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Гаузе Г.Ф., Дудник Ю.В. Противоопухолевые антибиотики. М.: Медицина; 1987:12–7. [Gause G.F., Dudnik Yu.V. Antitumor antibiotics. M.: Medicine; 1987:12–7. (In Russ.)].
2. Химиотерапия злокачественных опухолей. Под ред. Н.Н. Блохина. М.: Медицина; 1977:126–9 [Chemotherapy of malignant tumors. By ed. N.N. Blokhin M.: Medicine; 1977:126–9. (In Russ.)].
3. Gause G.F. Chromomycin, Olivomycin, Mithramycin. In: Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. Handbook of Experimental Pharmacology (Heffter-Heubner/New Series). Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1975. Vol. 38/2. Pp. 615–622. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-65806-8_32.
4. Vizcaino C., Mansilla S., Núñez L. E. et al. Novel mithramycins abrogate the involvement of protein factors in the transcription of cell cycle control genes. *Biochem Pharmacol* 2012;84:1133–42. PMID: 22981341. DOI:10.1016/j.bcp.2012.08.003.
5. Deacon K., Onion D., Kumari R. et al. Elevated SP-1 transcription factor expression and activity drives basal and hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in non-small cell lung cancer. *J Biol Chem* 2012;287(47):39967–81. PMID: 22992725. DOI: 10.1074/jbc.M112.397042.
6. Mir M.A., Majee S., Das S., Dasgupta D. Association of chromatin with anticancer antibiotics, mithramycin and chromomycin A3. *Bioorg Med Chem* 2003;11(13):2791–801. PMID: 12788353. DOI:10.1016/s0968-0896(03)00211-6.
7. Tagashira M., Kitagawa T., Isonishi S. et al. Mithramycin represses MDR1 gene expression in vitro, modulating multidrug resistance. *Biol Pharm Bul* 2000;23(8):926–9. PMID: 10963297.
8. González-Sabin J., Moris F. Exploring novel opportunities for aureolic acids as anticancer drugs. *Biochem & Pharmacol* 2013;2(1):1–3. DOI: 10.4172/2167-0501.1000e140.
9. Тевяшова А.Н. Оливомицин А – противоопухолевый антибиотик группы ауреолевой кислоты (обзор). *Химико-фармацевтический журнал* 2016;50(7):3–8. DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-7-3-8. [Tevyashova A.N. Olivomycin A – antitumor antibiotic of aureolic acid group. *Himiko-farmaceuticheskiy zhurnal* = *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2016;50(7):3–8. (In Russ.)].
10. Симонова В.С., Самусенко А.В., Филиппова Н.А. и др. Оливомицин вызывает апоптоз опухолевых клеток и подавляет P53-индуцированную транскрипцию. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2005;4:451–5. [Simonova V.S., Samusenko A.V., Filippova N.A. et al. Olivomycin causes tumor cell apoptosis and suppresses P53-induced transcription. *Billyuten experimentalnoy biologicheskoy mediciny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2005;4:451–5. (In Russ.)].
11. Tevyashova A.N., Olsufyeva E.N., Balzarini J. et al. Modification of the antibiotic olivomycin I at the 2'-keto group of the side chain. Novel derivatives, antitumor and topoisomerase I-poisoning activity. *J Antibiot (Tokyo)* 2009;62:37–41. PMID: 19132061. DOI: 10.1038/ja.2008.7.
12. Tevyashova A.N., Shtil A.A., Olsufyeva E.N. et al. Modification of olivomycin A at the side chain of the aglycon yields the derivative with perspective antitumor characteristics. *Bioorg Med Chem* 2011;19:7387–93. PMID: 22088308. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.10.055.
13. Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Кармакова Т.А. и др. Методические рекомендации по изучению фотоиндуцированных противоопухолевых свойств лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А.Н. Миронова и др. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. С. 13–24. [Yakubovskaya R.I., Kazachkina N.I., Karmakova T.A. et al. Methodical recommendations on the study of photoinduced antitumor properties of drugs. In: *Guide to conducting preclinical studies of medicines*. Ed. by A.N. Mironov. P.I. Moscow: Grif i K, 2012. Pp. 13–24. (In Russ.)].
14. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986:123.
15. Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P. et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. *Cancer Chemother Rep* 1966;50(4):219–44. PMID: 4957125.

ORCID авторов/ORCID of authors

Э.Р. Переверзева/E. R. Pereverzeva: <https://orcid.org/0000-0001-7368-9695>

В.А. Голибродо/V.A. Golibrod: <https://orcid.org/0000-0001-8643-6427>

А.Н. Тевяшова/A.N. Tevyashova: <https://orcid.org/0000-0003-1091-1011>

И.Д. Трещалин/I.D. Treschal: <https://orcid.org/0000-0001-7331-5490>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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