

УДК 615.2/.3.099:616-092.9

*А.А. Николина, Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева, В.А. Чалей, Н.П. Ермакова, В.М. Бухман***ИЗУЧЕНИЕ «ОСТРОЙ» ТОКСИЧНОСТИ  
НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА  
НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛОКАРБАЗОЛА – ЛХС-1208***ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва***Контактная информация***Николина Алёна Андреевна, аспирант лаборатории фармакологии и токсикологии НИИ ЭДнТО***адрес:** 115478 Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(499)111-85-49**e-mail:** [osipova.alio@ya.ru](mailto:osipova.alio@ya.ru)

Статья поступила 16.11.2015, принята к печати 27.11.2015.

**Резюме**

Исследование посвящено изучению «острой» токсичности лекарственного средства на основе производного индокарбазола – ЛХС-1208 – на мышах и крысах, самках и самцах, при двух путях введения (внутрибрюшинно и внутривенно). Для экспериментов использовались лабораторные животные – беспородные белые крысы и мыши-гибриды первого поколения (C57Bl/6J×DBA2)F1 (B6D2F1). В результате исследований были получены расчетные токсические дозы лекарственного средства на основе производного индокарбазола при внутрибрюшинном применении мышам, самкам и самцам.

**Ключевые слова:** острая токсичность, производные индокарбазола.*A.A. Nikolina, N.Yu. Kul'bachevskaja, O.I. Konjaeva, V.A. Chalej, N.P. Ermakova, V.M. Bukhman***STUDY OF ACUTE TOXICITY  
OF NOVEL ANTITUMOR PREPARATION BASED  
ON DERIVATIVE OF INDOLOCARBAZOLE – LCS-1208***FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow***Abstract**

The research has been devoted to the study of acute toxicity of preparation based on derivative of indolocarbazole – LCS-1208 in mice of both sexes and in rats of both sexes at intravenous and intraperitoneal administration of the drug. In the experiments the laboratory animals – outbred white rats and hybrid mice (C57Bl/6J×DBA2)F1 (B6D2F1) have been used. On the results of study has been obtained the calculated toxic doses of novel preparation based on derivative of indolocarbazole at intraperitoneal administration of the drug in mice of both sexes.

**Key words:** acute toxicity, derivatives of indolocarbazole.**Введение**

Огромные силы исследователей во всем мире направлены на поиск и создание эффективных противоопухолевых препаратов.

Важно, чтобы поиск эффективных соединений включал группы веществ, зарекомендовавших себя как активные соединения. Так, индокарбазола и их производные – интенсивно исследуемый класс противоопухолевых химических соединений. В частности, большое значение имеют производные, содержащие углеводные остатки, присоединенные к фармакофору [5].

Ранее было показано, что синтетические и природные соединения класса N-гликозидов индо[2,3-а]карбазола обладают различными видами биологической активности, в том числе противоопухолевой, что позволяет применять представителей этого класса в терапии больных злокачественными новообразованиями [6]. Проявление высокой

противоопухолевой активности у таких соединений, как, например, антибиотик ребеккамицин и ингибитор протеинкиназы С алкалоид стаурополин, способствовало поиску активных противоопухолевых препаратов среди их синтетических аналогов [3; 6; 7]. Противоопухолевые свойства этих соединений могут обуславливать различные механизмы: интеркаляция ДНК, ингибирование топоизомераз ДНК и ингибирование протеинкиназ [4; 8; 9]. Одним из представителей данного класса химических соединений является 6-амино-12-(α-L-арабинопиранозил)индо[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион, названный ЛХС-1208, обладающий высокой цитотоксической активностью *in vitro* на культурах опухолевых клеток человека: на раке толстой кишки LS 174T и раке яичников SKOV3 и проявляющий противоопухолевую активность *in vivo* на мышинных опухолевых моделях: на эпидермоидной карцине лёгкого Льюис (LCC), мышинной меланоме B16, раке шейке матки

РШМ-5 и других опухолях [1]. Полученные результаты по изучению эффективности лекарственного средства на основе производного индокарбазола, ЛХС-1208 [1], дали основание для передачи препарата на доклиническое токсикологическое изучение.

**Целью настоящего исследования** явилось изучение «острой» токсичности лекарственного средства на основе производного индокарбазола, ЛХС-1208, на мышах и крысах, самках и самцах, при двух путях введения (внутрибрюшинно и внутривенно).

### Материалы и методы

Исследования выполнены в соответствии с Международными и Российскими требованиями проведения научных исследований на лабораторных животных [2].

### Характеристика тест-системы для определения острой токсичности

Работа выполнена на 270 здоровых мышах-гибридах B6D2F1, самцах и самках, полученных из питомника «Столбовая» РАМН и 100 здоровых неинбредных беспородных крысах, самцах и самках, полученных из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все животные были здоровы, находились в стандартных условиях содержания и кормления.

### Исследуемый препарат

Наименование лекарственного препарата: ЛХС-1208.

Международное химическое наименование: 6-амино-12-( $\alpha$ -L-арабинопиранозил)индо[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-5,7-дион.

Соединение синтезировано лабораторией химического синтеза НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

ЛФ: лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 9,0 мг во флаконе. Лекарственная форма создана лабораторией разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

### Процедура введения

Изучение «острой» токсичности лекарственного средства ЛХС-1208 серии 020913 проводилось на мелких лабораторных животных при двух путях введения. Содержимое флакона растворяли в воде для инъекций до получения рекомендованной концентрации – 3,0 мг в 1 мл. Мышам ЛХС-1208 вводили внутривенно в диапазоне доз от 35 до 175 мг/кг, внутрибрюшинно – от 50 до 200 мг/кг. Крысам ЛХС-1208 вводили внутривенно в диапазоне доз от 50 до 125 мг/кг, внутрибрюшинно – от 60 до 100 мг/кг. Внутривенное введение препарата проводилось при стандартной скорости болюсного введения – 0,1 мл/сек, дозы препарата от 100 до 200 мг/кг мышам и от 80 до 125 мг/кг крысам разделяли на 2–3 введения с интервалом 2–3 часа (максимально возможные объемы при фиксированной концен-

трации). В качестве контроля использовали 2 группы интактных животных – самок и самцов. День введения препарата принимали за 0 (фон). Срок наблюдения за животными составил 30 суток.

### Время проведения экспериментов

Эксперименты на мышах проводились в период октябрь–декабрь 2013 г., на крысах – февраль 2014 г.

### Критерии оценки «острой» токсичности

Критерии оценки «острой» токсичности:

- число павших животных и сроки их гибели,
- клиническая картина интоксикации,
- изменение поведенческих реакций,
- патологические изменения в тканях и внутренних органах, выявляемые при аутопсии павших и выживших животных, выведенных из эксперимента в конце опыта (макроскопическая оценка).

Фиксировали все патологические изменения в поведении и клиническом состоянии животных.

### Методы статистической обработки данных

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Office Excel и BioStat Professional. Рассчитывали параметры, обычно используемые в токсикологии.

Расчет летальных доз проводили с использованием метода пробит-анализа. Летальные дозы представлены как Среднее  $\pm$  Ст.ош., для ЛД<sub>50</sub> в скобках дан 95 %-ный доверительный интервал. Количественные результаты изменений массы тела представлены как Среднее  $\pm$  Ст.откл.

### Результаты и обсуждение

#### «Острая» токсичность на мышах

При изучении «острой» токсичности на мышах, самках и самцах, при внутривенном применении лекарственного средства ЛХС-1208 в диапазоне доз от 35 до 175 мг/кг гибели животных не наблюдалось. У животных непосредственно после введения препарата во всех дозах в течение 3–30 мин в зависимости от примененной дозы наблюдались клонико-тонические судороги и в течение 1,5–2 ч адинамия, далее на протяжении всего срока наблюдения каких-либо клинических проявлений токсичности и изменений поведенческих реакций не отмечалось.

На основании полученных результатов (отсутствие гибели животных) расчетные токсические дозы лекарственного средства ЛХС-1208 при внутривенном применении мышам, самкам и самцам, не получены.

У мышей, самок и самцов, получавших препарат внутривенно во всех дозах, снижения массы тела животных по сравнению с изменениями массы тела животных контрольных групп не наблюдалось (табл. 1).

В табл. 1 представлены только репрезентативные данные, так как отличий в изменениях массы тела животных между группами не отмечалось.

При аутопсии выведенных из эксперимента животных – внутренние органы без особенностей.

При изучении «острой» токсичности на мышцах, самках и самцах, при внутрибрюшинном применении лекарственного средства ЛХС-1208 отмечалась гибель мышей после введения препарата в диапазоне доз от 130 до 200 мг/кг на 2; 3 и 4 сутки наблюдения (табл. 2).

У животных непосредственно после введения препарата во всех дозах отмечались одышка, адинамия, судорожное подергивание.

При аутопсии павших животных отмечено: сосуды брюшной полости инъецированы, края печени острые, селезенка и тимус визуально уменьшены; у некоторых животных выявлены очаговые кровоизлияния под твердую мозговую оболочку и небольшое количество свободной жидкости в плевральной полости.

У выживших животных каких-либо клинических проявлений токсичности и изменений в поведенческих реакциях не наблюдалось до конца опыта.

Полученные расчетные токсические дозы препарата ЛХС-1208 свидетельствуют об отсутствии половых различий у мышей при однократном внутрибрюшинном применении (табл. 3).

У мышей, самок и самцов, получавших препарат ЛХС-1208 внутрибрюшинно, отмечено дозозависимое снижение массы тела по сравнению с изменениями массы тела контрольных животных начиная с 3 суток и до конца опыта с тенденцией к восстановлению массы тела к 30 суткам наблюдения (табл. 4).

При аутопсии выведенных из эксперимента животных – внутренние органы без особенностей.

#### **«Острая» токсичность на крысах**

При изучении «острой» токсичности на крысах лекарственного средства ЛХС-1208 при внутривенном применении во всех изученных дозах гибели животных не наблюдалось.

У крыс непосредственно после введения препарата во всех дозах в течение 3–30 мин в зависимости от примененной дозы наблюдались клонико-тонические судороги и продолжающаяся в течение 1,5–2 ч адинамия, далее на протяжении всего срока наблюдения каких-либо клинических проявлений токсичности и изменений поведенческих реакций не отмечалось.

На основании полученных результатов (отсутствие гибели животных) расчетные токсические дозы лекарственного средства ЛХС-1208 при внутривенном применении крысам самкам и самцам не получены.

У крыс, самок и самцов, получавших лекарственное средство ЛХС-1208 внутривенно, во всех дозах снижения массы тела животных по сравнению с изменениями массы тела контрольных животных не наблюдалось (табл. 5).

При аутопсии выведенных из эксперимента животных – внутренние органы без особенностей.

При изучении «острой» токсичности на крысах лекарственного средства ЛХС-1208 при внутрибрюшинном применении во всех изученных дозах гибели животных не наблюдалось.

У крыс непосредственно после введения препарата во всех дозах в течение 3–30 мин в зависимости от примененной дозы наблюдались клонико-тонические судороги и в течение 1,5–2 ч адинамия, далее на протяжении всего срока наблюдения (30 суток) каких-либо клинических проявлений токсичности и изменений поведенческих реакций не отмечалось.

На основании полученных результатов (отсутствие гибели животных) расчетные токсические дозы лекарственного средства ЛХС-1208 при внутрибрюшинном применении крысам, самкам и самцам, получены не были.

На рис.1 и 2 показано, что у крыс, самок и самцов, получавших лекарственное средство ЛХС-1208 внутрибрюшинно, отмечалось дозозависимое снижение массы тела начиная с 3 суток и до конца опыта с тенденцией к восстановлению массы тела к 30 суткам наблюдения.

При аутопсии выведенных из эксперимента животных – внутренние органы без особенностей.

#### **Заключение**

Изучена «острая» токсичность ЛХС-1208 на мелких лабораторных животных (мышях и крысах) обоего пола при двух путях введения (внутривенно и внутрибрюшинно) в диапазоне доз. Получены следующие результаты:

- Установлено, что у мышей и крыс, получавших лекарственное средство ЛХС-1208 внутривенно в течение 3–30 мин, в зависимости от примененной дозы наблюдались клонико-тонические судороги и адинамия в течение 1,5–2 ч. У мышей и крыс, получавших лекарственное средство ЛХС-1208 внутрибрюшинно, непосредственно после введения препарата во всех дозах отмечены одышка, адинамия, судорожное подергивание.
- Получены расчетные токсические дозы лекарственного средства ЛХС-1208 при внутрибрюшинном применении мышам-гибридам B6D2F1: для мышей-самок  $LD_{50} - 143 (134 \div 170)$  мг/кг; для мышей самцов  $LD_{50} - 143 (136 \div 159)$  мг/кг. Установлено, что при применении лекарственного средства ЛХС-1208 в фиксированной концентрации и максимально возможных объемах внутривенно мышам и внутривенно и внутрибрюшинно крысам гибели животных не наблюдалось, в связи с этим расчетные токсические дозы лекарственного средства ЛХС-1208 не получены.

Таблица 1

Изменения массы тела мышей-гибридов B6D2F1 при изучении «острой» токсичности лекарственного средства ЛХС-1208 при внутривенном применении

Доза, мг/кг	Масса тела животных после введения препарата на сутки:						
	0	3	7	10	14	21	30
Мыши-самки							
0	18,3±0,7	19,7±0,8	19,5±1,2	20,1±1,1	20,2±1,2	21,4±1,3	21,9±1,2
50	19,5±0,5	20,0±0,4	20,4±0,5	21,0±0,6	20,8±0,7	21,2±0,8	21,7±0,7
75	19,5±0,4	20,8±1,0	21,0±0,4	21,8±0,5	22,3±0,6	22,6±0,8	23,3±0,7
100	22,8±2,5	22,4±2,4	23,3±2,8	24,0±2,6	25,1±2,4	25,8±2,6	27,4±2,6
Мыши-самцы							
0	23,3±1,9	23,6±1,5	24,0±1,9	25,0±2,2	24,9±2,2	25,4±2,2	25,7±2,0
50	22,8±1,3	22,7±0,8	23,5±0,5	24,1±0,5	24,6±0,7	25,3±0,8	24,4±2,4
75	22,3±1,8	24,6±1,4	25,4±1,3	25,5±1,4	26,3±1,4	27,2±1,8	27,6±1,8
100	24,0±1,2	23,9±1,3	24,4±1,2	24,2±0,8	25,1±0,8	25,8±1,1	27,5±1,0
175	25,3±3,2	25,4±3,4	25,8±3,2	24,9±1,6	27,3±3,3	27,5±3,7	28,7±3,8

Таблица 2

Токсичность лекарственного средства ЛХС-1208 при однократном внутрибрюшинном применении мышам-гибридам B6D2F1

Доза препарата (мг/кг)	Пало/всего	Сроки гибели
Мыши-самки		
0	0/6	—
50	0/6	—
100	0/6	—
120	0/6	—
130	2/6	2; 2
140	2/6	2; 3
150	4/6	2; 2; 2; 4
200	6/6	2; 2; 2; 2; 2; 2
Мыши-самцы		
0	0/6	—
50	0/6	—
100	0/6	—
120	0/6	—
130	1/6	2
140	1/6	2
150	5/6	2; 2; 2; 2; 2
200	6/6	2; 2; 2; 2; 2; 2

Таблица 3

Расчетные токсические дозы лекарственного средства ЛХС-1208 при внутрибрюшинном применении мышам-гибридам B6D2F1

Пол животного	Доза, мг/кг			
	ЛД <sub>10</sub>	ЛД <sub>16</sub>	ЛД <sub>50</sub>	ЛД <sub>84</sub>
Самцы	131±10	134±8	143±6 (136÷159)	154±14
Самки	124±14	128±11	143±9 (134÷170)	159±24

Таблица 4

Изменения массы тела мышей – гибридов B6D2F1 – при изучении «острой» токсичности лекарственного средства ЛХС-1208 при внутрибрюшинном применении

Доза, мг/кг	Масса тела животных на сутки после введения препарата					
	Фон (0)	3	7	14	21	30
Мыши-самки						
0	21,1±0,8	21,0±0,9	21,4±0,7	23,3±2,0	22,2±0,9	23,4±1,3
50	20,1±1,1	20,0±1,2	21,0±1,3	21,3±1,2	22,1±1,4	22,7±1,7
100	19,9±1,2	19,9±1,3	19,3±0,8	21,1±0,7	21,9±0,6	22,9±1,2
120	20,4±0,9	20,3±0,9	21,4±0,9	21,4±0,9	22,0±1,0	22,7±1,4
130	21,9±0,6	21,3±0,2	22,6±0,3	20,2±0,5	23,1±0,6	24,0±0,5
140	21,1±0,8	20,4±0,8	21,9±0,6	21,6±0,5	22,7±0,3	23,5±0,7
150	21,2±1,5	20,8±2,1	21,1±1,3	21,7±1,3	23,2±1,6	23,5±1,3
200	20,6±0,9	20,7±1,0	—**	—**	—**	—**
Мыши-самцы						
0	24,2±1,5	23,9±2,3	25,3±1,6	26,7±1,5	28,2±1,6	30,2±0,2
50	23,0±1,5	23,8±2,6	24,0±2,0	24,3±1,9	25,5±1,8	27,1±1,9
100	22,7±1,3	22,0±1,0	24,3±1,2	24,8±1,3	26,0±1,5	28,0±0,0
120	25,7±1,4	25,6±1,0	26,7±1,6	27,5±1,8	28,7±2,0	28,4±3,2
130	26,2±0,9	25,7±1,1	27,3±1,1	28,0±1,1	29,1±1,1	30,4±1,1
140	26,0±1,3	25,1±1,3	27,1±1,1	27,9±1,2	28,9±1,3	29,7±1,6
150	22,3±1,1	20,5*	22,7*	23,4*	24,4*	25,1*
200	23,5±1,3	23,4±1,3	—**	—**	—**	—**
*недостаточное количество животных для статистической обработки						
**все животные в данной группе погибли						

Таблица 5

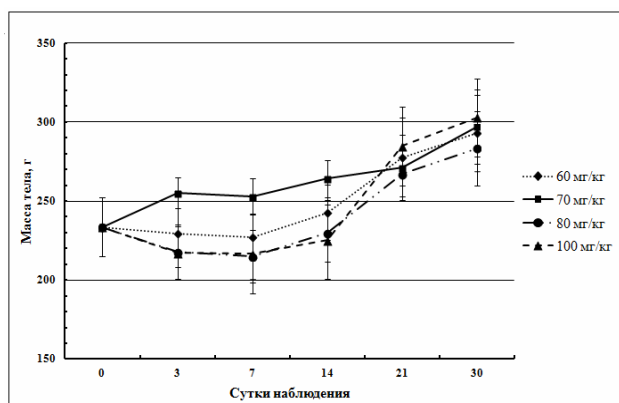
Изменения массы тела неинбредных крыс при изучении «острой» токсичности лекарственного средства ЛХС-1208 при внутривенном применении

Доза, мг/кг	Масса тела животных на сутки после введения препарата						
	Фон (0)	3	7	10	14	21	30
Крысы-самцы							
0	174±16	186±16	208±14	225±17	252±27	292±38	298±53
50	172±13	185±12	208±11	220±13	253±19	301±24	330±22
75	175±9	179±8	191±5	201±10	255±23	305±20	336±20
100	149±12	162±24	178±25	185±26	220±21	275±21	295±39
125	174±12	177±11	192±13	212±10	249±16	294±14	323±17
Крысы-самки							
0	159±14	168±16	194±16	200±16	215±15	243±15	260±13
50	159±8	163±6	183±8	190±9	219±13	249±16	268±16
75	156±10	167±12	184±11	196±12	203±19	249±18	270±22
100	152±7	158±9	177±10	178±9	201±12	227±18	244±23
125	160±8	160±8	181±11	189±11	209±15	234±13	252±17

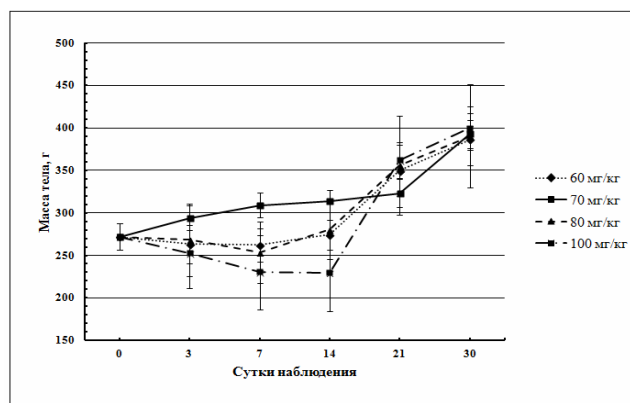
- Установлено отсутствие половых отличий для мелких лабораторных животных при применении лекарственного средства ЛХС-1208 при однократном внутривенном и внутривентральном применении.
- Установлено, что гибель мышей при применении лекарственного средства ЛХС-1208 при внутривентральном применении наступает на 2–4 сутки на фоне средне выраженных сосудистых нарушений.
- Установлено, что у мышей и крыс, получавших лекарственное средство ЛХС-

- 1208 внутривентрально во всех дозах, наблюдалось дозозависимое снижение массы тела, по сравнению с изменениями массы тела контрольных животных. У мышей и крыс, получавших лекарственное средство ЛХС-1208 внутривенно, изменений массы тела животных по сравнению с контрольными животными не наблюдалось.

Полученные результаты по изучению «острой» токсичности явились основанием для дальнейшего доклинического токсикологического изучения лекарственного средства ЛХС-1208.



**Рис. 1.** Изменения массы тела неинбредных крыс-самок при изучении «острой» токсичности лекарственного средства ЛХС-1208 при внутривентральном применении.



**Рис. 2.** Изменения массы тела неинбредных крыс-самцов при изучении «острой» токсичности лекарственного средства ЛХС-1208 при внутривентральном применении.

## Литература

1. Патент №2548045 Российская Федерация, МПК C07H 19/04, A61P 35/00, A61K 31/7008. N-гликозиды индоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазолов, обладающие противоопухолевой активностью / Тихонова Н. И., Ярцева И. В., Ерёмкина В. А., Эктова Л. В. и др.; заявитель и патентообладатель – ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. – № 2014107507; заявл. 21.02.14; опубл. 10.04.15, Бюл. № 10 – 13 с.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ под ред. Р.У.Хабриев. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
3. Смирнова З. С., Кубасова И. Ю., Борисова Л. М. Противоопухолевая активность N-гликозидов производных индоло[2,3-a]карбазола // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, №3. – С. 123–7.
4. Akinaga S., Sugiyama K., Akiyama T. UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) and other indolocarbazole compounds: a new generation of anti-cancer agents for new century? // Anticancer Drug Des. – 2000. – 15. – P. 43–52.
5. Kaluzhny D.N., Tatarskiy V.V. Jr., Dezhenskova L.G. et al. Novel antitumor L-Arabinose derivative of indolocarbazole with high affinity to DNA // Chem. Med. Chem. – 2009. – 4. – P. 1641–8.
6. Meng L.-H., Liao Z.Y., Pommier Y. Non-camptothecin DNK topoisomerase I inhibitors in cancer therapy // Curr. Top. Med. Chem. – 2003. – 3. – P. 305–20.
7. Pruhomme M. Recent developments of rebeccamycin analogues as topoisomerase I inhibitors and antitumor agents // Curr. Med. Chem. – 2000. – 7. – P. 1189–1212.
8. Pruhomme M. Rebeccamycin analogues as anti-cancer agents // Eur. J. Med. Chem. – 2003. – 38. – P. 123–40.
9. Sanchez C., Mendez C., Salas J.A.J. Engineering biosynthetic pathways to generate antitumor indolocarbazole derivatives // Ind Microbiol Biotechnol. – 2006. – 5. – P. 560–8.