

УДК 615.277.3.099:616-006-092.9

*В.А. Чалей, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, А.А. Николкина, В.М. Бухман, Н.Ю. Кульбачевская***ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ
НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ОРМУСТИН
НА МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ***ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва***Контактная информация***Чалей Вера Андреевна, научный сотрудник лаборатории фармакологии и токсикологии НИИ ЭДнТО*

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)612-78-83

e-mail: v.chaley@list.ru

Статья поступила 16.11.2015, принята к печати 27.11.2015.

Резюме

В работе представлены результаты изучения «острой» токсичности и промежуточные результаты изучения «субхронической» токсичности нового противоопухолевого препарата из класса нитрозомочевин – Ормустина – на мелких лабораторных животных. Для экспериментов использовались лабораторные животные – мыши-гибриды (C₅₇Bl/6_j×DBA/2)F1. самцы и самки, неинбредные крысы, самцы и самки. В результате исследований были получены расчетные токсические дозы Ормустина при внутривенном применении мышам и крысам; дана предварительная оценка влияния многократного внутривенного применения Ормустина на органы и системы организма крыс.

Ключевые слова: Ормустин, доклиническая токсичность, нитрозомочевины.*V.A. Chaley, O.I. Konyayeva, N.P. Ermakova, A.A. Nikolina, V.M. Bukhman, N.Yu. Kul'bachevskaya***NONCLINICAL STUDY
OF THE TOXICITY OF A NEW ANTICANCER DRUG ORMUSTIN
ON SMALL LABORATORY ANIMALS***FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», MH RF, Moscow***Abstract**

The paper presents the results of the study of «acute» toxicity and some results of the study of «subchronic» toxicity of Ormustin, a new anticancer drug belonging to nitrosourea class, in small laboratory animals. In the experiments the laboratory animals – hybrid mice (C₅₇Bl/6_j×DBA/2)F1 male and female and outbred male and female rats have been used. On the results of study has been obtained the calculated toxic doses of Ormustin at intravenous administration of the drug in mice and rats; has been given the preliminary assessment of the impact of Ormustin on organs and systems of rats at multiple intravenous administration.

Key words: Ormustin, nonclinical toxicity, nitrosoureas.**Введение**

Химиотерапия позволила добиться значительных успехов в лечении ряда злокачественных новообразований. Существует большой ассортимент препаратов для химиотерапии опухолей, но, тем не менее, проблема поиска новых фармакологических средств для терапии онкологических заболеваний по-прежнему остается крайне актуальной. Так, препараты класса нитрозомочевин широко и успешно применяются для лечения онкологических больных [6]. Молекулярные механизмы биологического действия этих соединений обусловлены выраженной реакционной способностью продуктов их биодegradации к алкилированию и карбомилированию макромолекул. Отличительными особенностями препаратов этого класса являются циклонеспецифичность действия, способность про-

никать через гематоэнцефалический барьер, высокая активность в отношении ряда солидных опухолей, отсутствие перекрестной резистентности с классическими алкилирующими агентами, что позволяет использовать их в комбинированной химиотерапии [2; 6; 7]. Однако низкая избирательность действия, отсроченная и кумулятивная токсичность лимитируют их клиническое применение [4]. В связи с этим поиск новых, более эффективных и менее токсичных соединений из указанного класса все еще продолжается. Так, в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН синтезировано новое соединение из класса нитрозомочевин – нитрозоуреидопроизводное диаминокарбоновой кислоты L-орнитина (Ормустин), вызывающее интерес в плане расширения спектра противоопухолевого действия лекарственных средств из этого класса [3].

В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России была разработана лекарственная форма «Ормустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» (далее – Ормустин) [5].

В исследованиях, проведенных в лаборатории экспериментальной химиотерапии и лаборатории комбинированной терапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Ормустин показал высокий противоопухолевый эффект на следующих перевиваемых опухолях: лимфоцитарная лейкемия Р-388, лимфоидная лейкемия L-1210, рак шейки матки РШМ-5, меланома В-16, эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC), а также на подкожных ксенографтах меланомы человека Mel7 [1; 3; 8; 9].

В связи с тем, что необходимым этапом разработки нового лекарственного средства является изучение его безвредности, *цель исследования* состояла в доклиническом изучении «острой» и «субхронической» токсичности нового противоопухолевого препарата Ормустина на мелких лабораторных животных. В данной работе представлены результаты изучения «острой» токсичности и частичные результаты изучения «субхронической» токсичности Ормустина на мышах и крысах.

Материалы и методы

Исследования выполнялись в соответствии с Международными и Российскими требованиями проведения научных исследований на лабораторных животных.

Изучение

«острой» токсичности Ормустина

Работа проведена на 120 здоровых мышах гибридах (C₅₇Bl/6_J×DBA/2)F1 (B6D2F1), самцах и самках, полученных из питомника «Столбовая», и 144 здоровых неинбредных крысах, самцах и самках, полученных из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России. Препарат вводили мышам и крысам в рекомендованной концентрации 15,7 мг/мл (растворитель – 5 %-ный р-р глюкозы) внутривенно однократно в диапазоне доз 120–300 мг/кг. В качестве контроля использовали интактных животных. Критериями оценки «острой» токсичности служили: число павших животных и сроки их гибели, клиническая картина интоксикации, изменения поведенческих реакций и патологические изменения в тканях и внутренних органах, выявляемые при аутопсии павших и выживших животных, умерщвленных в конце опыта (макроскопическая оценка). Фиксировали все патологические изменения в поведении и клиническом состоянии животных. Длительность наблюдения за животными после однократного введения Ормустина составляла 30 суток.

Изучение

«субхронической» токсичности Ормустина

Работа проведена на 40 здоровых неинбредных крысах-самцах, полученных из разведения

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Препарат вводили в рекомендованной концентрации 15,7 мг/мл (растворитель – 5 %-ный р-р глюкозы) внутривенно ежедневно 3-кратно в трёх дозах, рассчитанных, исходя из максимально переносимой дозы (МПД), определённой в опытах по «острой» токсичности на крысах при внутривенном введении:

- суммарная доза 300 мг/кг (=1,5 МПД), разовая доза 100 мг/кг;
- суммарная доза 200 мг/кг (=1 МПД), разовая доза 66,7 мг/кг;
- суммарная доза 100 мг/кг (=1/2 МПД), разовая доза 33,3 мг/кг.

День последнего введения препарата принимали за 0, фоновые показатели брали за 3 дня до начала введения препарата. В каждой группе животных использовали по 10 крыс, включая контроль, 5 крыс из каждой группы выводили из эксперимента на 3 сутки, остальные 5 – на 45 сутки после окончания курса введения препарата. Продолжительность наблюдения за животными после 3-кратного ежедневного внутривенного введения Ормустина составляла 45 суток.

Критерии оценки «субхронической» токсичности:

- число павших животных и сроки их гибели, клиническая картина интоксикации, данные клинико-лабораторных исследований,
- поведенческие реакции и патологические изменения в тканях и внутренних органах, выявляемые при аутопсии павших и выживших животных, выведенных из эксперимента в конце опыта (макроскопическая оценка).

При исследовании «субхронической» токсичности на крысах устанавливали уровни токсических доз, а именно – дозы, вызывающие значительные токсические изменения в органах и тканях – высокие токсические дозы; вызывающие слабые незначительные изменения – низкие токсические дозы, и не вызывающие нарушений в органах и тканях – высокие нетоксические дозы.

При изучении «субхронической» токсичности на крысах исследовали действие препарата на периферическую кровь, функциональное состояние органов и систем организмов животных.

Статистическая обработка 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 даны как Среднее±Стандартная ошибка, для ЛД₅₀ в скобках дан 95 %-ный доверительный интервал. Графические изображения результатов изменений массы тела и уровней циркулирующих в крови клеток представлены как Сред-

нее ± Стандартная ошибка; количественные результаты изменений массы тела и относительной массы органов представлены как Среднее ± Стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

«Острая» токсичность на мышах

При изучении «острой» токсичности Ормустина на мышах при внутривенном применении препарат, введенный самкам в дозах от 120 до 170 и самцам в дозах от 120 до 180 мг/кг, гибели животных не вызывал. Гибель животных наблюдалась на 5–12; 14 и 24 сутки наблюдения после введения препарата у самок в дозах 180–240 мг/кг и у самцов в дозах 200–300 мг/кг (табл. 1). Перед гибелью у животных отмечались: пилоэрекция, учащенное дыхание, сужение глазных щелей. На аутопсии павших животных обнаружены выраженные сосудистые нарушения (инъецирование сосудов головного мозга, кровоизлияние под твердую мозговую оболочку), признаки гастроинтестинальной токсичности (вздутие желудка и кишечника), уменьшение селезенки, атрофия тимуса, остальные органы – без особенностей.

Получены расчетные токсические дозы Ормустина при однократном внутривенном применении мышам (табл. 2). Отмеченные незначительные половые различия в величине расчетных токсических доз Ормустина у мышей находятся в пределах допустимой статистической погрешности.

У мышей, самок и самцов, получавших Ормустин во всех исследованных дозах, отмечено дозозависимое снижение массы тела по сравнению с изменениями массы тела контрольных групп начиная с 3 суток и до конца опыта с тенденцией к восстановлению массы тела к 30 суткам наблюдения. На графиках, иллюстрирующих изменение массы тела мышей-гибридов B6D2F1 при изучении «острой» токсичности Ормустина (рис. 1 и 2), приведены репрезентативные данные ввиду большого количества исследуемых доз.

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

«Острая» токсичность на крысах

При изучении «острой» токсичности Ормустина на крысах при внутривенном применении препарат, введенный в дозах от 120 до 180 мг/кг, гибели животных не вызывал. Отмечалась гибель животных на 2–15 сутки наблюдения после введения препарата в дозах от 200 до 300 мг/кг (табл. 3). Перед гибелью у крыс отмечены: пилоэрекция, учащенное дыхание, сужение глазных щелей, кровавые выделения из глаз и носа, диарея с кровью. На аутопсии павших животных обнаружены патологические изменения в органах, аналогичные изменениям в органах мышей.

Получены расчетные токсические дозы Ормустина при однократном внутривенном применении крысам (табл. 4). По величине расчетных ток-

сических доз Ормустина половых различий у крыс не обнаружено.

У крыс самок и самцов, получавших Ормустин в дозах от 120–180 мг/кг, резкого снижения массы тела не наблюдалось, однако в дозах 200–300 мг/кг отмечено резкое дозозависимое снижение массы тела по сравнению с изменениями массы тела контрольных животных, начиная с 3 суток и до конца наблюдения. На графиках, иллюстрирующих изменение массы тела неинбредных крыс при изучении «острой» токсичности Ормустина (рис. 3 и 4), приведены репрезентативные данные ввиду большого количества исследуемых доз. При аутопсии выведенных из эксперимента животных внутренние органы – без особенностей.

«Субхроническая» токсичность на крысах

В ходе исследований «субхронической» токсичности на крысах показано, что Ормустин во всех изученных дозах не вызывал гибели животных, не оказывал влияния на общее состояние животных, не изменял их поведенческие реакции. У крыс, получавших Ормустин во всех изученных дозах, на 7–14 сутки наблюдения развивалась дозозависимая алопеция, которая сохранялась в высокой дозе (суммарная доза 300 мг/кг) до конца опыта (рис. 5). Отмечены четкие дозозависимые колебания массы тела животных, получавших Ормустин. Препарат, введенный в суммарной дозе 100 мг/кг, не вызывал снижения массы тела животных по сравнению с контрольной группой на протяжении всего срока наблюдения. Изменения массы тела крыс колебались в пределах физиологических норм для данного вида животных. Препарат, введенный в суммарной дозе 200 мг/кг, вызвал «пик» уменьшения массы тела животных на 3 сутки наблюдения с последующим приростом показателя. Препарат, введенный в суммарной дозе 300 мг/кг, вызвал два «пика» уменьшения массы тела животных – на 3 и 21 сутки наблюдения. Животные, получавшие препарат в суммарных дозах 200 и 300 мг/кг, отставали в приросте массы тела по сравнению с контрольными животными на протяжении всего срока наблюдения (45 суток; табл. 5). Клинический анализ крови крыс после 3-кратного ежедневного внутривенного применения Ормустина показал, что препарат вызывал дозозависимое снижение числа лейкоцитов на 3 сутки после окончания курса введения с последующим восстановлением к 7 суткам наблюдения с соответствующим небольшим сдвигом лейкоцитарной формулы по сравнению с данными контрольных животных (рис. 6). У животных, получавших Ормустин в суммарной дозе 300 мг/кг, на 7–14 сутки после окончания введения препарата отмечалось резкое снижение числа тромбоцитов по сравнению с данными контрольных животных с восстановлением названного показателя к 21 суткам наблюдения (рис. 7). Число эритроцитов, количество гемоглобина и показатели гематокрита колебались на уровне показателей животных контрольной группы и в пределах физиологической нормы для данного вида.

Таблица 1

Токсичность Ормустина при однократном внутривенном введении мышам-гибридам В6D2F1

Доза, мг/кг	Пало/всего	Сроки гибели
Мыши-самки		
120	0/6	–
140	0/6	–
160	0/6	–
170	0/6	–
180	3/6	5; 7; 11
200	4/6	5; 5; 5; 7
220	5/6	6; 8; 10; 12; 12
240	6/6	6; 6; 6; 6; 6; 8
контроль	0/6	–
Мыши-самцы		
120	0/6	–
140	0/6	–
160	0/6	–
180	0/6	–
200	1/6	14
220	5/6	6; 8; 10; 10; 24
240	5/6	6; 6; 6; 6; 8
260	6/6	6; 6; 6; 6; 6; 11
280	6/6	6; 6; 6; 6; 6; 6
300	6/6	6; 6; 6; 6; 6; 6
контроль	0/6	–

Таблица 2

Расчетные токсические дозы Ормустина на мышках-гибридах В6D2F1 самцах и самках

Пол животного	Доза, мг/кг			
	ЛД10	ЛД16	ЛД50	ЛД84
Самки	169±9	174±8	192±6 (181÷206)	212±11
Самцы	193±11	197±10	213±7 (199÷226)	231±11

Таблица 3

Токсичность Ормустина при однократном внутривенном введении неинбредным крысам

Доза, мг/кг	Пало/всего	Сроки гибели
Крысы-самки		
120	0/6	–
140	0/6	–
160	0/6	–
170	0/6	–
180	0/6	–
200	1/6	10
210	5/6	5; 5; 5; 6; 10
220	6/6	2; 5; 5; 5; 5; 6
230	6/6	5; 5; 5; 6; 7; 10
250	6/6	6; 6; 6; 6; 6; 15
300	6/6	6; 6; 6; 6; 6; 13
контроль	0/6	–
Крысы-самцы		
120	0/6	–
140	0/6	–
160	0/6	–
170	0/6	–
180	0/6	–
200	1/6	6
210	6/6	6; 9; 9; 9; 10; 10
220	4/6	5; 5; 5; 6
230	5/6	7; 9; 9; 10; 10
250	6/6	6; 6; 6; 6; 6; 7
300	6/6	6; 6; 6; 6; 6; 7
контроль	0/6	–

Таблица 4

Расчетные токсические дозы Ормустина на неинбредных крысах, самцах и самках

Пол животного	Доза, мг/кг			
	ЛД10	ЛД16	ЛД50	ЛД84
Самки	172±5	178±5	200±5(191÷209)	224±7
Самцы	189±9	192±8	206±5(195÷215)	220±7

Таблица 5

Изменения массы тела неинбредных крыс-самцов после 3-кратного внутривенного ежедневного введения Ормустина

Суммарная доза, мг/кг	Масса тела животных на сутки после введения препарата, г						
	Фон	3	7	14	21	30	45
300	198±20	172±17	194±24	211±36	193±20	214±11	220 ±31
200	187±16	173±17	195±14	203±14	220±12	236±15	278±17
100	185±16	199±10	223±4	249±7	252±51	316±12	374±18
Контроль	194±15	200±17	234±19	272±24	297±24	333±26	387±27

Таблица 6

Относительная масса внутренних органов (г на 100 г массы тела) неинбредных крыс-самцов после 3-кратного внутривенного ежедневного введения Ормустина

Суммарная доза, мг/кг	Орган	Сутки забора органов	
		3	45
300	Тимус	0,10±0,01	0,14±0,03
200		0,14±0,04	0,16±0,05
100		0,14±0,03	0,15±0,03
Контроль		0,32±0,03	0,18±0,05
300	Почки	0,47±0,07	0,40±0,03
200		0,45±0,02	0,34±0,02
100		0,49±0,04	0,34±0,03
Контроль		0,47±0,02	0,31±0,02
300	Селезенка	0,26±0,02	0,26±0,03
200		0,31±0,04	0,26±0,05
100		0,34±0,03	0,31±0,04
Контроль		0,44±0,06	0,24±0,03

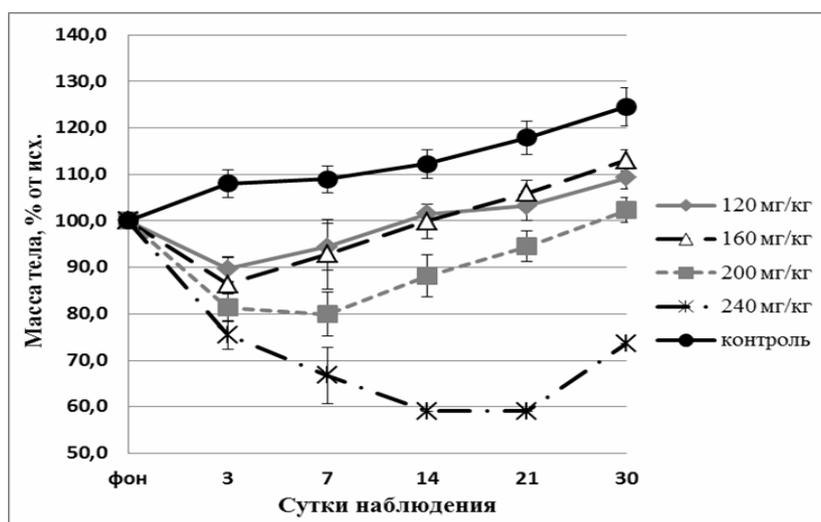


Рис. 1. Изменения массы тела мышей-самцов гибридов B6D2F1 при изучении «острой» токсичности Ормустина.

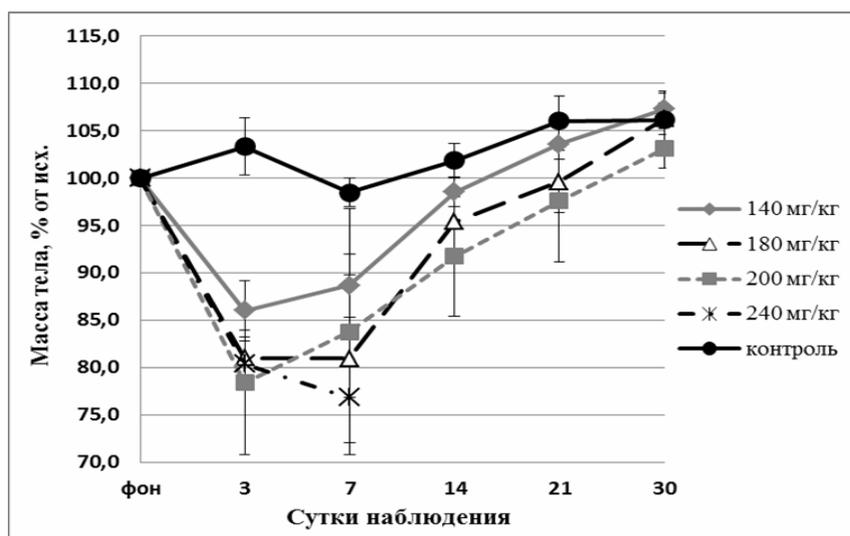


Рис. 2. Изменения массы тела мышей-самок гибридов В6D2F1 при изучении «острой» токсичности Ормустина

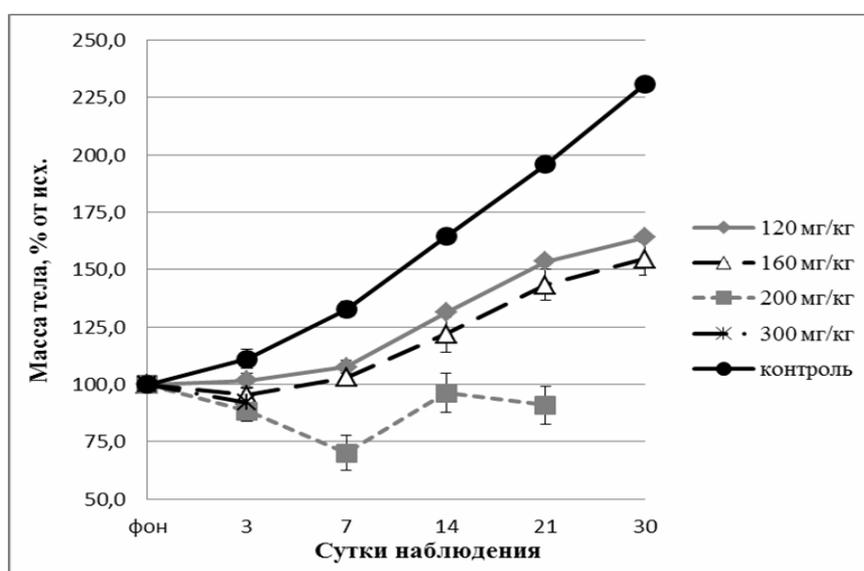


Рис. 3. Изменения массы тела неинбредных крыс-самцов при изучении «острой» токсичности Ормустина.

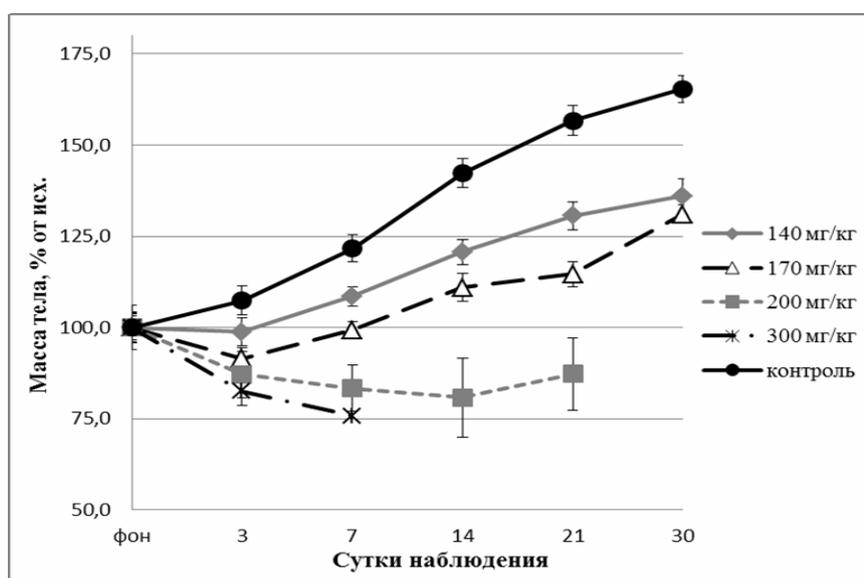


Рис. 4. Изменения массы тела неинбредных крыс-самок при изучении «острой» токсичности Ормустина



Рис. 5. Крыса с алопецией – Ормустин в суммарной дозе 300 мг/кг (слева) и крыса контрольной группы – 14 сутки наблюдения.

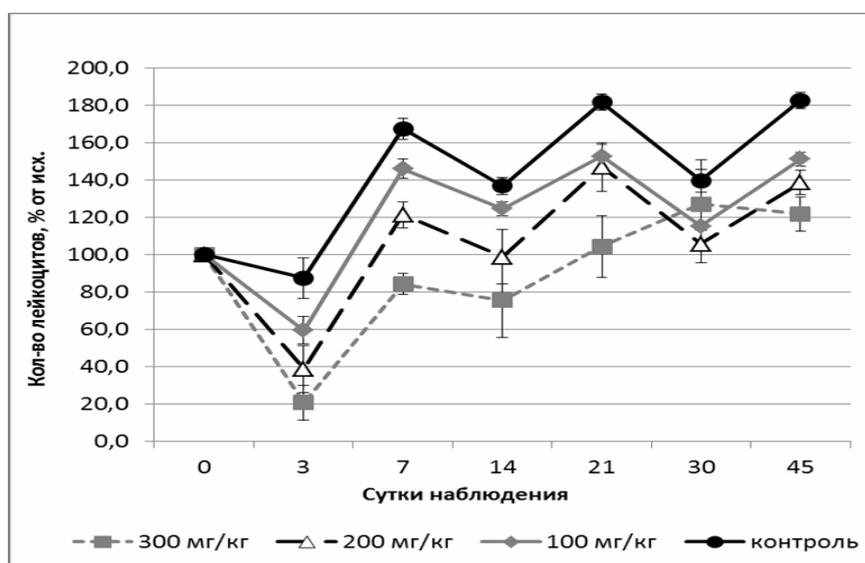


Рис. 6. Динамика уровня лейкоцитов в крови неинбредных крыс-самцов после 3-кратного внутривенного ежедневного введения Ормустина.

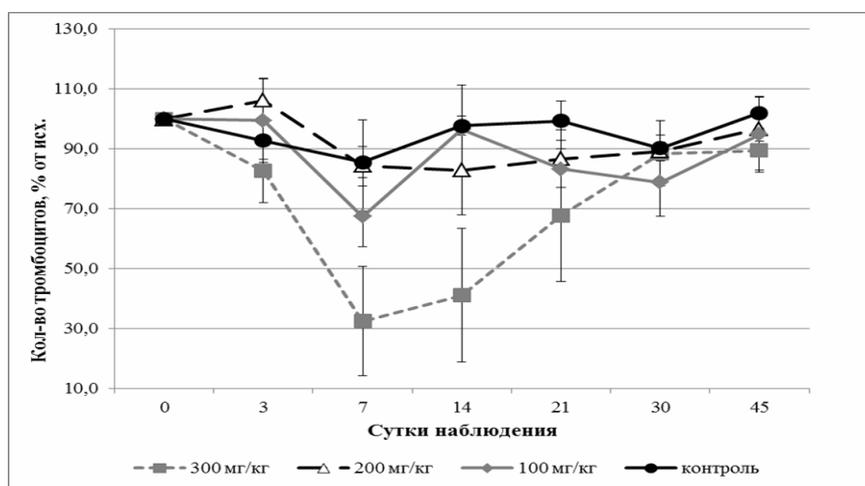


Рис. 7. Динамика уровня тромбоцитов в крови неинбредных крыс-самцов после 3-кратного внутривенного ежедневного введения Ормустина.

При аутопсии животных на ранний срок (3 сутки) морфометрически установлено дозозависимое уменьшение относительной массы тимуса и дозозависимое уменьшение относительной массы селезенки по сравнению с массой соответствующих органов контрольных животных. При аутопсии животных в поздний срок (45 сутки) морфометрически установлено неполное восстановление относительной массы тимуса и полное восстановление относительной массы селезенки по сравнению с показателями контрольной группы, а также увеличение относительной массы почек при применении Ормустина в суммарной дозе 300 мг/кг по сравнению с массой почек контрольных животных (табл. 6). Морфометрически установлено, что 3-кратное ежедневное внутривенное применение Ормустина во всех исследованных дозах не оказывало влияния на массу сердца и печени крыс. Оценка влияния Ормустина на состояние сердца, печени, поджелудочной железы и почек, а также определение лимитирующих видов токсичности и характеристика уровней токсических доз будут проведены после получения морфологических данных, которые находятся в стадии обработки. Работа по доклиническому изучению токсичности Ормустина продолжается.

Заключение

Таким образом, изучена «острая» токсичность Ормустина при однократном внутривенном применении в диапазоне доз на мышах и крысах, самках и самцах. Установлено, что гибель мышей при применении Ормустина наступает на 5–12; 14 и 24 сутки, а крыс на 2–15 сутки после введения препарата на фоне ярко выраженных сосудистых нарушений и гастроинтестинальной токсичности. Получены расчетные токсические дозы Ормустина

при однократном внутривенном применении: для мышей-самок ЛД₅₀ – 192 (181÷206) мг/кг; для мышей самцов ЛД₅₀ – 213 (199÷226) мг/кг; для крыс-самок ЛД₅₀ – 200 (191÷209) мг/кг; для крыс самцов ЛД₅₀ – 206 (195÷215) мг/кг. Установлено, что у мышей и крыс, получавших Ормустин во всех дозах, наблюдалось дозозависимое снижение массы тела по сравнению с изменениями массы тела контрольных животных. Изучена «субхроническая» токсичность Ормустина при 3-кратном ежедневном внутривенном применении неинбредным крысам-самцам. На основании полученных на настоящем этапе данных установлено, что:

- препарат при многократном внутривенном применении вызывает дозозависимую алопецию у крыс;
- Ормустин при многократном внутривенном применении вызывает дозозависимое снижение массы тела крыс;
- препарат оказывает влияние на показатели периферической крови крыс, вызывая дозозависимое снижение уровня лейкоцитов на 3 сутки после окончания курса введения с последующим восстановлением к 7 суткам наблюдения, и снижение уровня тромбоцитов при применении в суммарной дозе 300 мг/кг на 7–14 сутки после окончания курса введения с восстановлением к 21 суткам наблюдения;
- Ормустин на раннем сроке дозозависимо оказывает угнетающее влияние на лимфопролиферативные органы крыс (тимус, селезенка), вызывая снижение их массы, которая восстанавливается (тимуса – не полностью) к окончанию срока наблюдения.

Литература

1. Барышникова М.А., Альбассит Б., Сапрыкина Н.С. и др. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитрозоалкилмочевин // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т.12, №2. – С. 8.
2. Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т.13, №1. – С. 49–53.
3. Краснов В.П., Левит Г.Л., Барышникова М.А. и др. Нитрозомочевины на основе аминокислот. Оригинальный противоопухолевый препарат лизомустин // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т.12, №2. – С.46.
4. Краснов В.П., Чулахин О.Н., Левит Г.Л. и др. Химические аспекты создания оригинального противоопухолевого препарата лизомустин. М.И. Давыдов, А.Ю. Барышников (ред.). Экспериментальная онкология на рубеже веков. – М., издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. – С. 135–45.
5. Николаева Л.Л., Ланцова А.В., Санарова Е.В. и др. Парентеральная лекарственная форма нового соединения из класса алкилнитрозомочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т.14, №1. – С. 113.
6. Островская Л.А., Корман Д. Б., Дементьева Н.П. и др. Препараты класса нитрозоалкилмочевин в отечественной противоопухолевой химиотерапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 24–36.
7. Островская Л.А., Филов В.А., Ивин Б.А. и др. Хлонизол – новый эффективный противоопухолевый препарат класса нитрозоалкилмочевин // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 37–48.
8. Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Калишьян М.С. и др. Сравнительное изучение нового нитрозопроизводного ормустина с мюстофораном на подкожных ксенографтах меланомы человека Me17 // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т.14, №1. – С. 132–3.
9. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Противоопухолевая эффективность ормустина, нового препарата класса алкилнитрозомочевин, в отношении перевиваемых опухолей мышей // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т.14, №1. – С. 133.