

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТАРГЕТНОГО ПРЕПАРАТА АИМПИЛА

Э.Р. Переверзева¹, В.А. Голибродо¹, М.И. Трещалин¹, Н.В. Еремкин¹, С.А. Цуркан², И.Д. Трещалин¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»;

Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1;

²ООО «Фармацевтический научный центр “ФармАксесс”»; Россия, 127322 Москва, ул. Милашенкова, 10, оф. 195

Контакты: Василиса Антоновна Голибродо vasilisa2006@gmail.com

Введение. В настоящее время активно проводится поиск лекарственных средств, направленно воздействующих на специфические молекулярные или клеточные мишени опухолей. Таргетный противоопухолевый препарат аимпила представляет собой нековалентный комплекс альфа-фетопротейна (АФП) с атрактилозидом. Основой для его разработки послужила способность АФП как транспортного белка доставлять цитотоксические агенты в клетки, имеющие рецепторы к АФП.

Цель исследования — изучение токсичности препарата аимпила в хроническом эксперименте на кроликах.

Материалы и методы. В исследовании использовано 60 кроликов породы «Советская шиншилла», самцов и самок. Препарат в виде готовой лекарственной формы — желатиновых капсул — вводили перорально в 1 и 10 терапевтических дозах (0,05 и 0,5 мг/кг соответственно) ежедневно в течение 30 сут. В ходе исследования у животных определяли массу тела, проводили клинический и биохимический анализы крови, анализ мочи, снимали электрокардиограмму. На 1-е и 30-е сутки по окончании курса введений по 5 животных из каждой группы подвергали эвтаназии и затем проводили патоморфологическое исследование их внутренних органов.

Результаты. Исследование показало, что ежедневное пероральное применение аимпила в течение 30 сут в дозе, эквивалентной 1 терапевтической, не оказывает влияния на клинико-лабораторные показатели и структуру органов и тканей кроликов. У животных, получавших высокую дозу препарата, были обнаружены признаки гепато-, нефро-, кардио- и гастроинтестинальной токсичности. Повреждения структуры печени, найденные при микроскопическом анализе, клинически выражались в виде достоверного увеличения уровня аспаратаминоотрансферазы в сыворотке крови. Морфологические изменения почек сопровождались значимым повышением уровней уробилиногена и кетоновых тел в моче. Признаки кардио- и гастроинтестинальной токсичности выявлялись только при патоморфологическом исследовании органов. Обнаруженные изменения были обратимы в течение 30 сут.

Выводы. Выявленные токсические свойства лекарственной формы аимпила дозозависимы и обратимы. Препарат рекомендуется для дальнейшего изучения.

Ключевые слова: аимпила, альфа-фетопротейн, атрактилозид, хроническая токсичность, кролики

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-61-66

EXPERIMENTAL EVALUATION OF TOXIC PROPERTIES OF TARGET ANTITUMOR DRUG AIMPILA

E.R. Pereverzeva¹, V.A. Golibrodov¹, M.I. Treshchalin¹, N.V. Eremkin¹, S.A. Tsurkan², I.D. Treshchalin¹

¹Gause Institute of New Antibiotics; 11 Bldg. 1 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119021, Russia;

²Pharmaceutical Scientific Center “PharmAccess” Ltd.; of. 195, 10 Milashenkova St., 127322 Moscow, Russia

Background. Currently, the drugs, acting directly on tumor molecular or cellular targets, are actively designed. Target antitumor drug aimpila is atractyloside alpha-fetoprotein noncovalent complex. The development of this formulation is based on the ability of alpha-fetoprotein, as a transport protein, to deliver cytotoxic agents into the cells that have alpha-fetoprotein receptors.

Objective: to investigate the toxicity of aimpila in chronic experiment on rabbits.

Materials and methods. The study was performed in male and female “Soviet chinchilla” rabbits. Final drug formulation (aimpila in gelatin capsules) was administered per os at 1 and 10 therapeutic doses (0.05 and 0.5 mg/kg respectively) for 30 days with interval of 24 h. During the study dynamics of body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography and urinalysis were performed for all animals. Five animals in each group were sacrificed in days 1 and 30 post treatment, then their internal organs were subjected to histological evaluation.

Results. The study demonstrates that the treatment with aimpila for 30 days in single therapeutic dose of 0.05 mg/kg had no effect on the clinical and laboratory parameters or the morphological structure of the internal organs of rabbits. Signs of hepato-, nephro-, cardio- and gastrointestinal toxicity were found in group of rabbits, treated with high dose of drug. The structural damages in liver were clinically supported with a significant increase of aspartate aminotransferase level in serum. Pathological changes in the kidneys were accom-

panied by a significant increase of urobilinogen and ketone bodies levels in the urine. Signs of cardio- and gastrointestinal toxicity were documented only by microscopic pathology observation. These abnormalities were reversible within 30 days.

Conclusions. Aimpila formulation displayed dose-dependent and reversible toxicity and can be recommended to further investigation.

Key words: aimpila, alpha-fetoprotein, atractyloside, chronic toxicity, rabbits

Введение

Используемые в настоящее время противоопухолевые препараты обладают низкой избирательностью действия, что приводит к развитию серьезных побочных эффектов. Повышение избирательности действия лекарственных средств может быть достигнуто введением в их состав векторных молекул, способных связываться со специфическими рецепторами, расположенными на поверхности клеток-мишеней [1]. Векторами могут служить различные биомолекулы, в частности онкофетальные белки. Так, для этой цели активно используется альфа-фетопrotein (АФП), рецепторы к которому были найдены в клетках опухолей определенного гистогенеза. К тому же АФП способен выполнять функцию транспортного белка и обладает свойством формировать конъюгаты и комплексы с различными, в том числе противоопухолевыми, агентами [2, 3].

Препарат аимпила, разработанный в ООО «Фармацевтический научный центр “ФармАксесс”», представляет собой нековалентный комплекс АФП с атрактилозидом (АТР). АТР — гликозид природного происхождения, воздействующий на митохондриальную функцию клеток и вызывающий в дальнейшем их апоптоз [4–6]. Аимпила проявила высокую противоопухолевую активность в экспериментальных исследованиях. Для дальнейшего продвижения препарата необходима оценка его побочного действия при длительном пероральном введении. Оптимальной моделью, позволяющей провести изучение токсических свойств лекарственной формы аимпила, рекомендуемой для клинического применения, являются кролики.

Материалы и методы

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [7].

В эксперименте использовали 60 кроликов породы «Советская шиншилла», самцов и самок с массой тела 1,8–2,0 кг, полученных из питомника «Белый мох». После карантина в течение 2 нед были сформированы 6 групп (по 3 группы самцов и самок) по 10 животных. Кроликам экспериментальных групп перорально вводили желатиновые капсулы с индивидуально рассчитанным на массу тела каждого

кролика количеством капсульной массы. Состав капсульной массы был следующим: 0,001 г субстанции аимпила; 0,02 г лактозы; 0,112 г микрокристаллической целлюлозы 102; 0,007 г кремния диоксида коллоидного. Разовые дозы, эквивалентные 1 и 10 терапевтическим дозам (ТД), составляли 0,05 и 0,5 мг/кг соответственно. Величина ТД для кроликов была получена при пересчете с эффективной ТД для мышей с использованием k_m -фактора [8].

Клинико-лабораторные и патоморфологические исследования проводили в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [9]. Перед началом введения определяли фоновые показатели (массу тела животного, клиническую картину крови). На протяжении всего эксперимента наблюдали за состоянием и поведением животных, регистрировали изменения массы тела, производили исследование состава периферической крови, устанавливая количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, гемоглобина, лейкоцитарную формулу, величину гематокрита при помощи автоматического гематологического анализатора Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия). Используя автоматический биохимический анализатор ChemWell (Awareness Technology Inc., США), на 1-е и 30-е сутки по окончании курса введений препарата в сыворотке крови животных определяли уровни аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы, креатинина, мочевины, билирубина (прямого и общего), общего белка, альбумина, глюкозы. В эти же сроки с использованием автоматического анализатора мочи Laura Smart (Erba Lachema, Чехия) производили клинический анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тела, белок, уробилиноген, удельный вес, глюкоза, нитраты) и регистрировали электрокардиограмму во II стандартном отведении при помощи электрокардиографа ЭК1Т-07 («Аксион», Россия).

Половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии на 1-е сутки после окончания курса, остальных — спустя 30 сут после окончания курса введений препарата. На вскрытии проводили исследование состояния органов грудной и брюшной полости. Сердце, печень, почки, селезенку и тимус взвешивали при помощи весов CE153-C («Сартогосм», Россия) и определяли их массовые коэффициенты. Участки органов фиксировали в 10 % нейтральном

формалине, по стандартной методике заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Полученные количественные данные подвергали статистической обработке при помощи компьютерных программ StatPlus 2006 и Microsoft Excel с использованием *t*-критерия Фишера–Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

Ежедневное 30-кратное введение аймпила в изученных дозах не вызывало гибели животных, не оказывало влияния на прирост массы тела и поведенческие реакции.

На протяжении всего эксперимента клинические показатели периферической крови колебались в пределах физиологической нормы и не отличались от показателей контрольной группы.

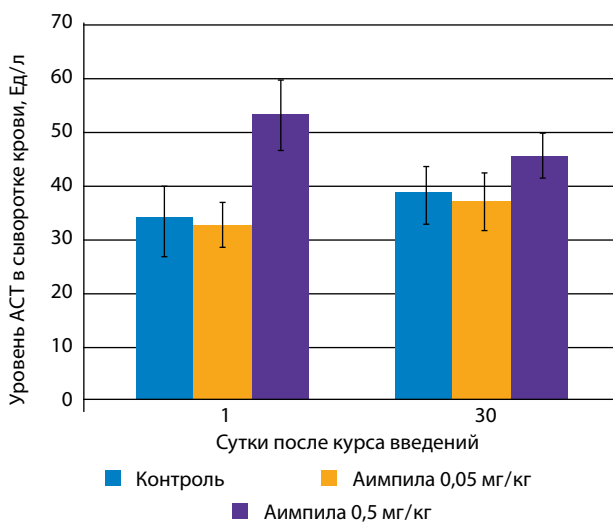


Рис. 1. Активность АСТ в сыворотке крови самцов кроликов на 1-е и 30-е сутки после курса введений аймпила

При биохимическом исследовании сыворотки крови на 1-е сутки после окончания курса введения аймпила в разовой дозе, 10-кратно превышающей ТД, как у самцов, так и у самок было зарегистрировано достоверное увеличение активности АСТ по сравнению с контрольной группой (рис. 1). На этом же сроке наблюдения при патоморфологическом исследовании были обнаружены изменения в ткани печени в виде микронекрозов вблизи портальных трактов и центральных вен, зернистой или вакуольной дистрофии гепатоцитов вокруг отдельных триад (рис. 2). К концу эксперимента уровень АСТ возвращался к нормальным значениям, структура печени восстанавливалась.

При исследовании состава мочи на 1-е и 30-е сутки после курса введений у кроликов, получавших препарат в обеих изученных дозах, было обнаружено достоверное по сравнению с контролем повышение уровня кетоновых тел, а у животных, получавших препарат в большей дозе (0,5 мг/кг), — повышение уровня уробилиногена. Десятикратное превышение ТД приводило к возникновению дистрофических изменений эпителия извитых канальцев корковой и юкстамедуллярной зон почек, интерстициального и периваскулярного отека в юкстамедуллярной зоне (рис. 3), появлению клеточного детрита в просвете прямых канальцев мозговой зоны.

К 30-м суткам после курса введений препарата у большинства животных структура почек восстанавливалась. У отдельных животных на месте поврежденных канальцев формировались кисты.

Анализ электрокардиограммы кроликов, получавших препарат в обеих изученных дозах, не выявил его кардиотоксических свойств. При патоморфологическом исследовании было отмечено повреждающее действие препарата на структуру сердечной мышцы только у отдельных животных,

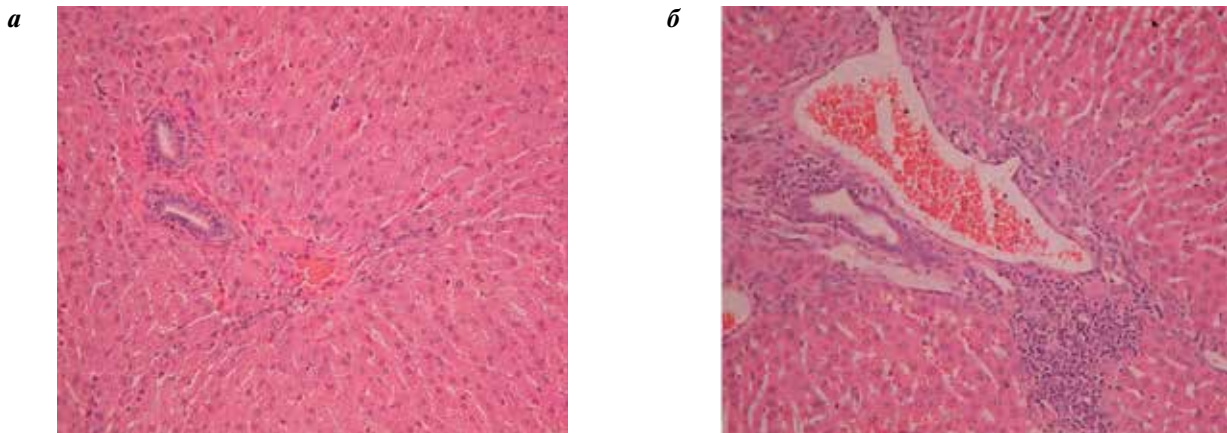


Рис. 2. Печень ($\times 20$): а — интактный контроль; б — аймпила 0,5 мг/кг $\times 30$ сут, 1-е сутки после курса введений: очаг микронекроза вблизи триады

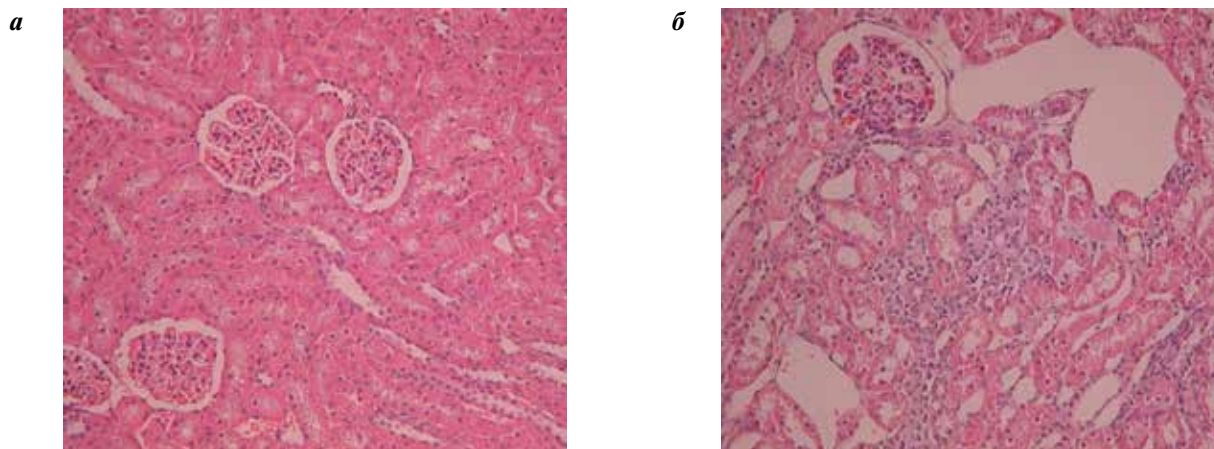


Рис. 3. Почка, юкстамедуллярная зона ($\times 20$): а — интактный контроль; б — аимпила 0,5 мг/кг $\times 30$ сут, 1-е сутки после курса введений: сильный периваскулярный отек, резкое расширение просвета капсулы клубочка, очаги деструкции извитых канальцев

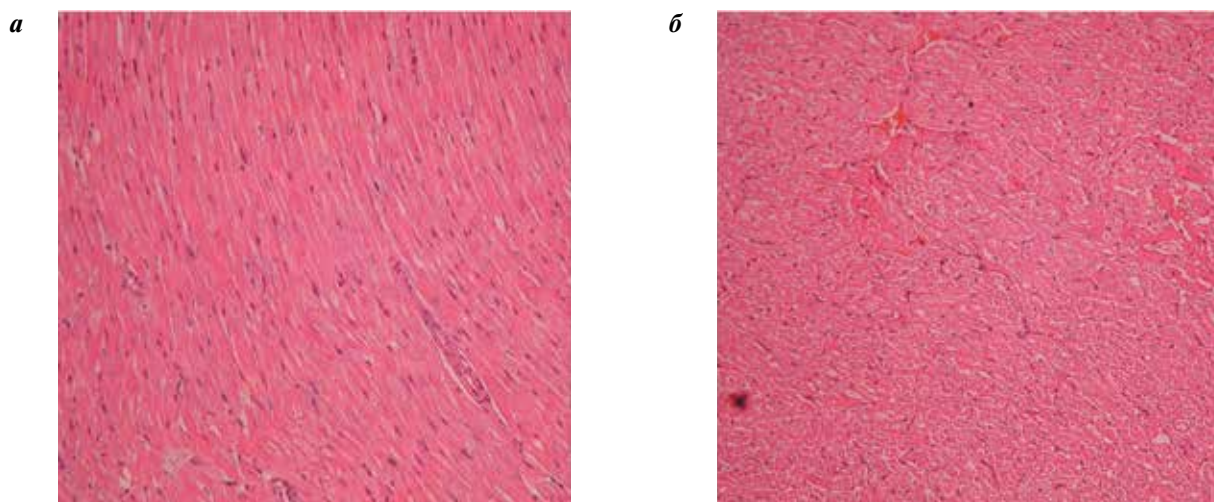


Рис. 4. Миокард ($\times 20$): а — интактный контроль; б — аимпила 0,5 мг/кг $\times 30$ сут, 1-е сутки после курса введений: мелкие очаги токсической кардиомиопатии

получавших аимпилу в разовой дозе, 10-кратно превышающей ТД. Оно выражалось в появлении множественных мелких очагов токсической кардиомиопатии (рис. 4) и единичных крупных очагов отека интерстиция. К 30-м суткам после курса введений аимпилы происходило полное восстановление структуры миокарда.

Местно-тканевые реакции слизистой оболочки желудка на пероральное введение препарата в ТД были выражены слабо. При 10-кратном превышении ТД они выражались в изменении соотношения главных и обкладочных клеток в железах и умеренной очаговой атрофии эпителия желез и покровно-ямочного эпителия (рис. 5), которые проявлялись сразу после курса введений аимпилы. К 30-м суткам по окончании курса структура слизистой оболочки желудка полностью восстанавливалась.

Обсуждение

Одним из подходов к улучшению терапевтических свойств противоопухолевых препаратов является формирование таргетных конструкций с АФП, который специфически взаимодействует с АФП-рецепторами опухолевых клеток. Разработка векторных композиций такого рода может быть основана на создании конъюгатов, в которых АФП ковалентно связан с антибластомным агентом или же образует с ним нековалентный комплекс [2]. Так, были получены конъюгаты АФП с доксорубицином, блеомицином, карминомицином, дауномицином, эспермицином, исследования которых подтвердили наличие выраженной противоопухолевой активности наряду со снижением токсичности по сравнению со свободным препаратом [2, 10, 11]. Нековалентные АФП-комплексы обладают рядом преимуществ, среди которых наиболее важным является доставка

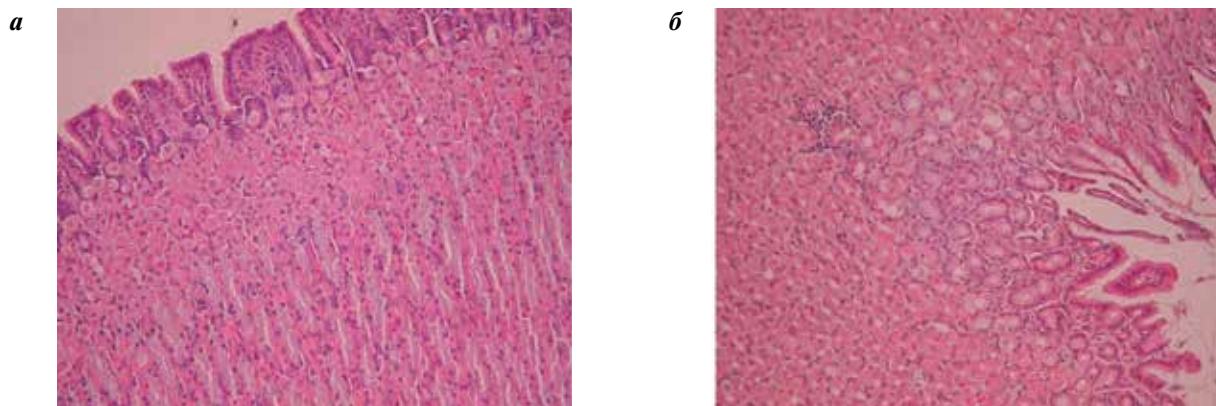


Рис. 5. Желудок ($\times 20$): а — интактный контроль; б — аимпила 0,5 мг/кг \times 30 сут, 1-е сутки после курса введений: очаг атрофии и деструкции покровно-ямочного эпителия, мелкий лимфогистиоцитарный инфильтрат

высокотоксичных агентов непосредственно в опухолевую клетку [2].

Препарат аимпила представляет собой нековалентный комплекс АФП с АТР — токсином, используемым в народной медицине стран Южной Африки. Токсические свойства АТР известны: у людей при отравлении им возникают массивные некрозы в печени и почках [4, 6, 12]. Поскольку АФП даже при длительном применении в высоких дозах не оказывает повреждающего действия на структуру и функцию органов и тканей экспериментальных животных [13], обнаруженные в настоящем исследовании гепато- и нефротоксические эффекты, по-видимому, связаны с влиянием АТР. Одним из механизмов действия АТР является ингибирование окислительного фосфорилирования в митохондриях [4, 6, 12, 14], что обуславливает выраженное влияние этого соединения на клетки, богатые митохондриями, в частности гепатоциты и клетки проксимальных канальцев почек.

Гепато- и нефротоксические свойства АТР при парентеральном введении были изучены в экспериментах на лабораторных животных [4, 15–17]. Клинические и патоморфологические данные о его повреждающем действии на структуру и функцию печени, описанные в ряде работ [4, 16], совпадают с результатами настоящего исследования, что подтверждает предположение о том, что токсические свойства аимпила определяются токсичностью АТР.

При изучении нефротоксичности АТР было показано, что даже однократное внутрибрюшинное введение этого соединения крысам и мышам

в переносимых дозах приводит к повреждению проксимальных канальцев. Влияние на ткань почек морских свинок и кроликов было обнаружено при введении летальных доз АТР [4, 15]. В настоящем исследовании, проведенном на кроликах, аимпила при длительном применении в высокой дозе, 10-кратно превышающей ТД, также проявила нефротоксические свойства, близкие по морфологическим и клиническим проявлениям к тем, которые были описаны для АТР.

Морфологическое проявление кардиотоксичности аимпила, вероятно, объясняется изменением биодоступности АТР к клеткам миокарда, так как, по данным литературы, АТР не оказывает влияния на структуру и функцию сердца [6, 15, 18].

Таким образом, проведенное токсикологическое изучение лекарственной формы препарата аимпила позволяет сделать вывод о ее безвредности при применении в ТД.

Выводы

Курсовое применение пероральной лекарственной формы аимпила в ТД не оказывает влияния на структуру и функции основных органов и систем кроликов. При значительных передозировках возможно проявление гепато-, нефро- и кардиотоксических свойств препарата. Выявленная зависимость повреждающего действия аимпила от величины примененной дозы и обратимость токсических эффектов позволяют рекомендовать изученную лекарственную форму аимпила для дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Северин С.Е., Москалева Е.Ю., Посыпанова Г.А. Таргетная терапия рака. Природа 2013;12:71–7.

2. Pak V. The use of a-fetoprotein for the delivery of cytotoxic payloads to cancer cells. Ther Deliv 2014;5(8):885–92.

DOI: 10.4155/tde.14.59. PMID: 25337646.
3. Posypanova G.A., Gorokhovets N.V., Makarov V.A. et al. Recombinant alpha-

- fetoprotein C-terminal fragment: the new recombinant vector for targeted delivery. *J Drug Target* 2008;16(4): 321–8. PMID: 18446611.
4. Daniele C., Dahamna S., Firuzi O. et. al. *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol* 2005;97:175–81. DOI: 10.1016/j.jep.2004.11.025. PMID: 15707749.
 5. Obatomi D.K., Bach P.H. Selective cytotoxicity associated with *in vitro* exposure of fresh rat renal fragments and continuous cell lines to atractyloside. *Arch Toxicol* 1996;71(1–2):93–8. PMID: 9010590.
 6. Stewart M.J., Steenkamp V. The biochemistry and toxicity of atractyloside: a review. *Ther Drug Monit* 2000;22(6): 641–9. PMID: 11128230.
 7. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986:123.
 8. 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.
 9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Часть I. М.: Гриф и Ко, 2012. С. 13–24.
 10. Feldman N.B., Kiselev S.M., Gukasova N.V. et al. Antitumor activity of alpha-fetoprotein conjugate with doxorubicin in vitro and in vivo. *Biochemistry* 2000;65(8):967–71. PMID: 11002192.
 11. Nikolskaya E.D., Zhunina O.A., Yabbarov N.G. et al. Development of target delivery system based on actinomycin class drugs and recombinant alpha-fetoprotein. *Dokl Biochem Biophys* 2017;473(1):148–50. DOI: 10.1134/S1607672917020156. PMID: 28510139.
 12. Barceloux D.G. Medical toxicology of natural substances. Foods, fungi, medicinal herbs, plants and venomous animal. California: John Wiley & Sons, 2008. Pp. 514–517.
 13. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А. и др. Альфа-фетопротеин. Екатеринбург: УрО РАН, 2004. С. 104–129.
 14. Obatomi D.K., Thanh N.T., Brant S., Bach P.H. The toxic mechanism and metabolic effects of atractyloside in precision-cut pig kidney and liver slices. *Arch Toxicol* 1998;72(8):524–30. PMID: 9765068.
 15. Carpenedo F., Luciani F., Scaravilli F. et al. Nephrotoxic effect of atractyloside in rats. *Arch Toxicol* 1974;32(3):169–80. PMID: 4479740.
 16. Hedili A., Warnet J., Thevenin M., Martin C. et.al. Biochemical investigation of *Atractylis gummifera* L. hepatotoxicity in the rat. *Arch Toxicol Suppl* 1989;13:312–5. PMID: 2774952.
 17. Koechel D.A., Krejci M.E. Extrarenal and direct renal actions of atractyloside contribute to its acute nephrotoxicity in pentobarbital-anesthetized dogs. *Toxicology* 1993;79(1):45–66. PMID: 8475499.
 18. Gilmour R.F.Jr., Williams E.S., Farmer B.B., Zipes D.P. Effects of carnitine and atractyloside on canine cardiac electrical activity. *Am J Physiol* 1981;241(4):505–12. PMID: 7315975.