

© Коллектив авторов, 2015
УДК 616.314.17-008.1
DOI – <http://dx.doi.org/10.14300/mnnc.2015.10098>
ISSN – 2073-8137

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ДОКСОРУБИЦИНА И ЕГО НИОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ

И. А. Базиков, Э. В. Бейер, В. В. Лукинова, А. Н. Мальцев

Ставропольский государственный медицинский университет, Россия

COMPARATIVE EVALUATION OF ACUTE TOXICITY DOXORUBICIN AND ITS IN NIOSOMES

Bazikov I. A., Beyer E. V., Lukinova V. V., Maltsev A. N.

Stavropol State Medical University, Russia

Исследован диапазон переносимых, токсических и летальных доз ниосомальной и стандартной форм противоопухолевого антибиотика доксорубицина при внутрибрюшинном пути введения на лабораторных животных. Обнаружено, что LD50 ниосомального доксорубицина составила $5,5 \pm 0,7$ мг/кг для крыс и $4,0 \pm 0,6$ мг/кг для мышей обоего пола. У животных, получавших обычную форму антибиотика, этот показатель оказался выше – $14,2 \pm 1,2$ мг/кг и $10,8 \pm 1,0$ мг/кг соответственно. Существуют незначительные половые различия в чувствительности животных к испытываемому препарату. Для самцов крыс и мышей значения LD50 оказались несколько выше, чем для самок, однако эти данные не выходили за рамки недостоверной тенденции.

Ключевые слова: доксорубицин, ниосомы, острая токсичность

The range of endurable, toxic and lethal doses of niosomal and standard forms of antitumor antibiotic doxorubicin was investigated. It was administered to laboratory animals intraperitoneally. It was found that the LD50 of doxorubicin in niosomes was $5,5 \pm 0,7$ mg/kg in rats and $4,0 \pm 0,6$ mg/kg for mice of both sexes. In the animals treated with the usual form of the antibiotic, this index was higher – $14,2 \pm 1,2$ mg/kg and $10,8 \pm 1,0$ mg/kg, respectively. There are minor gender differences in the sensitivity of animals to test drug. For male rats and mice LD50 values were slightly higher than for females, but these data were not beyond false trends.

Key words: doxorubicin, niosomes, acute toxicity

Рост количества онкологических заболеваний определяет острую необходимость создания новых высокоэффективных противоопухолевых препаратов. В настоящее время созданы антибиотики, имеющие выраженную онкостатическую активность. К сожалению, многие из них не обладают избирательным действием, поэтому наряду с опухолевыми клетками повреждают здоровые ткани и органы. Низкая проницаемость противоопухолевых препаратов через кожу является существенным недостатком, потому что делает невозможным локальное нанесение лекарственного средства.

Одним из высокоэффективных противоопухолевых препаратов является доксорубицин – антибиотик, обладающий цитостатическим эффектом. Механизм его действия заключа-

ется во взаимодействии с ДНК, образовании свободных радикалов и подавлении синтеза нуклеиновых кислот. Доксорубицин преимущественно метаболизируется в печени, после внутривенного введения быстро исчезает из крови, концентрируясь в печени, почках, миокарде, селезенке, легких. Препарат показан для лечения лимфобластного лейкоза, саркомы мягких тканей, остеогенной саркомы, саркомы Юинга, рака молочной железы, рака щитовидной железы и других опухолевых заболеваний. Доксорубицин обладает большим количеством побочных эффектов, в том числе выраженным гепато- и кардиотоксическим эффектом, что ограничивает возможность его клинического применения.

Для расширения спектра использования данного препарата был создан ниосомальный доксорубицин, представляющий лекарственную форму, в которой антибиотик заключен

в кремнийорганические микрокапсулы (ниосомы). Они состоят из ПЭГ-12 Диметикона, обладающего амфифильными свойствами, позволяющими ориентироваться в дисперсии водорастворимой частью (полиэтиленгликолем) в воду и жирорастворимой частью (диметиконом) – в липиды. Вследствие такой структуры легко образуются микрокапсулы при встряхивании. При обработке ультразвуком мультислойные микрокапсулы образуют моноламеллярную структуру, иммобилизуя биологически активные вещества (БАВ). Их размер становится менее 100 нанометров. Тонкая эластичная оболочка позволяет им передвигаться по межклеточным промежуткам, представляющим собой липидный матрикс. Такой способ доставки позволит пролонгировать действие препарата за счет постепенного высвобождения и повысить его активность. Кроме того, существует возможность создания новых ниосомальных лекарственных форм для трансдермального нанесения препарата, что может быть эффективно использовано для лечения рака кожи.

Целью работы явилось сравнительное изучение острой токсичности ниосомальной и традиционной форм доксорубина при внутрибрюшинном введении.

Материал и методы. Опыты выполнены на двух видах лабораторных животных – крысах и мышах. Подготовку животных к опыту проводили в соответствии с указаниями ОФС «испытание на токсичность» ГФ XI. Подбор в группы (6 самцов и 6 самок) проводили произвольно методом «случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от средних показателей в группе более чем на 10 % и составляли 220–240 г у крыс и 18–20 г у мышей. Доксорубин или его ниосомальную форму вводили однократно внутрибрюшинно в дозах 2, 4, 8, 12, 16 и 20 мг/кг крысам и 1, 2, 4, 8, 12 и 14 мг/кг мышам. Крысы контрольной группы получали аналогичные объемы физиологического раствора.

В течение 14 суток проводили наблюдение за общим состоянием, поведением животных и возможной гибелью, а также проявлением симптомов интоксикации. Регистрировали: интенсивность двигательной активности, наличие и характер судорог, координацию движений, тонус скелетных мышц, реакции на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покровов, окраски слизистых оболочек, особенности потребления корма и воды, изменения массы тела.

Летальные дозы определяли с помощью пробит-анализа.

Проводилось макроскопическое изучение патологоанатомических изменений различных

органов: печени, легких, почек, сердца, селезенки, головного мозга, семенников (у самцов), яичников (у самок), желудка, тонкого кишечника.

Исследования выполняли в полном соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая» (2012) [7] и Правилами лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 708н от 23.08.2010) [1]. Эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986) [9] и Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 [3].

Исследования выполняли согласно утвержденному письменному протоколу, плану доклинических исследований и в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП).

Животных содержали в виварии СтГМУ согласно санитарным правилам и на стандартном рационе в соответствии с приказом МЗ СССР № 1045-73 от 06.04.1973 [2]; Правилами лабораторной практики [1] и приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 [4].

Статистическую обработку полученных данных проводили на персональном компьютере с помощью прикладных программ «Statistica» (версия 6,0) и «Excel».

Результаты и обсуждение. Наблюдение за животными в ходе изучения острой токсичности препарата выявило изменения в ряде физиологических показателей особой опытных групп. В зависимости от дозы введенных препаратов в различной степени отмечалось снижение двигательной активности крыс и мышей, уменьшение потребления пищи и воды, учащение сердцебиения и дыхания, а также усиление потоотделения. У животных, получавших исследуемый препарат в максимальных дозах, отмечалось значительное угнетение локомоции, резкое снижение реакции на тактильные, болевые звуковые и световые раздражители, бледность окраски слизистых оболочек, снижение массы тела. Сроки гибели крыс находились в прямой зависимости от дозы введенного антибиотика. Первыми, в день начала эксперимента, погибли животные, получившие максимальное количество традиционной формы доксорубина. Гибель животных, получивших ниосомальный доксорубин в максимальной дозе, наблюдалась спустя сутки. Последние животные, получавшие доксорубин, пали на второй день эксперимента, а ниосомальную форму антибиотика – к исходу 3-го дня после введения препарата.

Необходимо отметить, что контрольные инъекции физиологического раствора не вызвали каких-либо изменений физиологического состояния животных и не привели к их гибели.

Результаты определения диапазона переносимых, токсических и летальных доз доксорубина и его ниосомальной формы для крыс представлены в таблицах 1 и 2. LD50 ниосомальной доксорубина составила $5,5 \pm 0,7$ мг/кг, в то время как LD50 обычной формы антибиотика почти в три раза превосходила это значение и достигала $14,2 \pm 1,2$ мг/кг. Обнаружены значительные отличия и по другим показателям токсичности.

Таблица 1

Определение диапазона переносимых, токсических и летальных доз ниосомального доксорубина у крыс (мг/кг)

Доза	Все животные	Самцы	Самки
LD10	2,5	2,4	2,5
LD16	2,9	2,9	3,0
LD50	$5,5 \pm 0,7$	$5,7 \pm 0,7$	$5,3 \pm 0,7$
LD84	10,3	11,0	9,5

Таблица 2

Определение диапазона переносимых, токсических и летальных доз доксорубина у крыс (мг/кг)

Доза	Все животные	Самцы	Самки
LD10	9,5	9,2	9,3
LD16	10,4	10,0	10,3
LD50	$14,2 \pm 1,2$	$13,7 \pm 1,1$	$14,7 \pm 1,2$
LD84	19,4	18,8	20,9

Результаты определения летальных доз доксорубина и его ниосомальной формы для мышей представлены в таблицах 3 и 4. LD50 для животных, получавших доксорубин, составила $10,8 \pm 1,0$ мг/кг, ниосомальную форму препарата – $4,0 \pm 0,6$ мг/кг.

Таблица 3

Определение диапазона переносимых, токсических и летальных доз ниосомального доксорубина у мышей (мг/кг)

Доза	Все животные	Самцы	Самки
LD10	1,0	1,0	1,0
LD16	1,4	1,4	1,4
LD50	$4,0 \pm 0,6$	$4,3 \pm 0,6$	$3,9 \pm 0,6$
LD84	11,8	13,3	10,5

Таблица 4

Определение диапазона переносимых, токсических и летальных доз доксорубина у мышей (мг/кг)

Доза	Все животные	Самцы	Самки
LD10	5,5	5,9	5,1
LD16	6,4	6,8	6,0
LD50	$10,8 \pm 1,0$	$11,1 \pm 1,05$	$10,5 \pm 1,02$
LD84	18,3	18,2	18,4

Половые различия по всему диапазону переносимых и летальных доз препаратов для крыс и мышей были выражены незначительно.

Результаты макроскопического исследования погибших животных

У крыс и мышей всех экспериментальных групп выявлено повреждение кожных покровов в виде скарификаций от расчесов. Эпителий кончика носа, кожные покровы тела и лап с синюшным оттенком. Геморрагии, очажки альтераций в указанных отделах отсутствуют. Просветы воздухоносных путей свободны. В плевральной полости у крыс и мышей опытных групп обнаруживается выраженный серозный экссудат. Париетальный листок плевры серовато-розового вида. Легкие маловоздушные, на разрезе розового цвета. Листки перикарда тонкие прозрачные. Сердце увеличено в размерах, упруго-эластичной консистенции на ощупь, темно-красного цвета. Вены коронарного бассейна с выраженным полнокровием. Остановка сердца произошла в систоле.

Листки брюшины сероватого оттенка, гладкие, блестящие. Печень увеличена в размерах, дряблая, красно-вишневого вида. Капсула ее гладкая, прозрачная. Воротная вена полнокровная. На поверхности разреза печени стекает умеренное количество темно-красной жидкости. Обнаружен трупный венозный гипостаз, который естественно наблюдается при мортификации.

Серозная оболочка тонкого кишечника, прямой кишки сероватого вида.

Желудок и кишечник сильно вздуты, заполнены кашицеобразной массой. Отмечается значительное истончение стенки желудка, складки разглажены, при ревизии желудочно-кишечного тракта крупные язвы и множественные точечные кровоизлияния не выявлены.

Селезенка серповидной формы, увеличенных размеров, массой 4 грамма. Почки бобовидной формы, темно-красного цвета, массой 0,5 грамма. На разрезе хорошо контурируются корковое и мозговое вещество органа. Параренальная клетчатка умеренно выражена. Надпочечники серовато-кремового вида, округлой формы и прилежат к верхнему полюсу почек.

Головной мозг с признаками отека. Очагов кровоизлияния не выявлено.

Результаты макроскопического исследования позволяют предположить, что причиной гибели животных, получавших доксорубин или его ниосомальную форму, явилась токсическая кардиомиопатия, вызвавшая острую сердечную недостаточность.

Заключение. При сравнительном анализе диапазона переносимых, токсических и летальных доз ниосомальной и стандартной лекарственных форм доксорубина при внутрибрюшинном введении лабораторным животным установлено, что среднесмертельная доза (LD50) ниосомального доксорубина составила $5,5 \pm 0,7$ для крыс и $4,0 \pm 0,6$ мг/кг для мышей обоего пола. У животных, получавших обычную форму антибиотика, этот показатель оказался

выше – $14,2 \pm 1,2$ мг/кг и $10,8 \pm 1,0$ мг/кг соответственно. Существуют незначительные половые различия в чувствительности животных к испытуемому препарату. Для самцов крыс и мышей значения LD50 оказались несколько выше, чем для самок, однако эти данные статистически не достоверны.

Таким образом, заключение доксорубина в нисомы резко повышает его диффузионную активность. Эти факты необходимо учитывать при подборе доз для проведения хронических токсикологических исследований и для дальнейшего использования препарата в клинической практике.

Литература

1. Правила лабораторной практики // Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 708 н от 23.08.2010.
2. Приказ МЗ СССР № 1045-73 от 06.04.1973 «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».
3. Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».
4. Приказ МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения».
5. Приказ Минздравсоцразвития России № 750н от 26 августа 2010 г. «Об утверждении правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и формы заключения комиссии экспертов».
6. Приказ Минздравсоцразвития России № 1413н от 23 ноября 2011 г. «Об утверждении методических рекомендаций по содержанию и оформлению необходимых документов, из которых формируется регистрационное досье на лекарственный препарат для медицинского применения в целях его государственной регистрации».
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А. Н. Миронова. – М.: Изд-во «Гриф и К», 2012.
8. European Convention for Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986.

References

1. Rules laboratory practice. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation № 708 dated 23.08.2010.
2. Order of the Ministry of Health of the USSR № 1045-73 from 04.06.1973, the «Sanitary rules on the device, equipment and maintenance experimental biological clinics (vivariums)».
3. An order from the Ministry of Health of the USSR № 755 from 08.12.1977 «Regulations of work with the use of experimental animals».
4. Order of the Ministry of Health of the USSR from 10.10.1983 № 1179 «On approval of specifications of forage expenditures for laboratory animals in health care».
5. Order of the Health Ministry of Russia № 750n August 26, 2010 «On approval of rules of examination of drugs for medical use and form conclusions of the commission of experts».
6. Order of the Health Ministry of Russia № 1413n on November 23, 2011 «On approval of guidelines on the content and preparation of necessary documents, which make up a registration dossier for the drug for medical use for the purpose of its state registration».
7. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part One: Moscow, 2012.
8. European Convention for Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986.

Сведения об авторах:

Базиков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии; тел.: (8652)352475, 89188664027; e-mail: bazikov@list.ru

Бейер Эдуард Владимирович, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии; тел.: (8652)354881; e-mail: pharmacology@stgma.ru

Лукинова Вера Валерьевна, ассистент кафедры микробиологии; тел.: (8652)352475

Мальцев Александр Николаевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией нанотехнологий лекарственных средств; тел.: (8652)352475, 89054172205; e-mail: Maltsev7@rambler.ru