

ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИКЛОФОСФАМИДА И ЗОЛЕДРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ПОДОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Лепешко П. Н.¹, Соболев Ю. А.², Семёнов И. П.¹

*¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

*²Государственное учреждение «Научно-практический центр
Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Приведены результаты подострого эксперимента при пероральном введении лабораторным животным водных растворов фармацевтических субстанций циклофосфамида и золедроновой кислоты. Установлено, что циклофосфамид способен оказывать выраженные биологические эффекты на белых крыс и приводить к срыву адаптационных возможностей организма животных. Золедроновая кислота вызывала менее выраженные биологические ответы, которые характеризовались гемотоксическим и нефротоксическим действием.

Ключевые слова: токсикология, циклофосфамид, золедроновая кислота, подострый эксперимент, биологическое действие.

Введение. Злокачественные новообразования являются глобальной проблемой современности не только в медицине и биологии, но и в социальной жизни общества. Проблема затрагивает интересы практически всех категорий населения. Из восьми смертей в мире одна

является следствием онкологических заболеваний, рак является причиной большего числа смертных случаев, чем СПИД, туберкулез и малярия вместе взятые. По данным Международного агентства по изучению рака (МАИР), ежегодно в мире регистрируется более 12 млн

новых случаев рака и около 6,2 млн смертей от него. Ежегодный темп прироста злокачественных новообразований составляет примерно 2 %, что превышает на 0,3–0,5 % рост численности населения мира [1].

Неутешителен прогноз экспертов ВОЗ: онкологическая заболеваемость во всем мире возрастет к 2050 г. до 24 млн случаев, а смертность до 16 млн ежегодно регистрируемых случаев [2]. Согласно расчетам МАИР (2005 г.), в Европе ежегодно следует ожидать 2,9 млн новых случаев заболевания раком и 1,7 млн смертельных случаев от него [3]. Но современная медицина стремительно развивается, и с каждым годом появляется все больше методов лечения злокачественных новообразований, а также купирования их развития. Одним из методов является химиотерапия лекарственными средствами, одним из которых является циклофосфамид.

При раке возможно метастазирование в кости, а также развитие злокачественной гиперкальциемии, для профилактики которых используется золедроновая кислота.

Внедрение в производство новых лекарственных средств требует создания безопасных в гигиеническом отношении рабочих мест, что, наряду с соблюдением требований техники безопасности, обеспечивается соблюдением содержания вредных химических веществ в воздухе рабочей зоны в определенных безопасных концентрациях. Следовательно, для химических веществ, используемых в производственном цикле фармацевтических производств, исходя из установленных критериев должны разрабатываться предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных химических веществ. Одним из этапов установления ПДК вредных химических веществ является проведение подострого эксперимента, который позволяет установить особенности биологического действия химических веществ при повторном пероральном поступлении, а также выявить различные органы-мишени и биологические маркеры, что позволяет установить критические точки при планировании дальнейших экспериментов по обоснованию ПДК.

Цель работы — установить в подостром эксперименте особенности биологического действия при пероральном пути поступления фармацевтических субстанций циклофосфамида и золедроновой кислоты.

Материалы и методы. Эксперименты с лабораторными животными проводились с соблюдением правил биоэтики, принципов над-

лежащей лабораторной практики и международных требований [4].

Токсиколого-гигиеническое изучение кумулятивных свойств фармацевтических субстанций циклофосфамида и золедроновой кислоты выполнено в соответствии с методическими требованиями инструкций 1.1.11-12-206-2003 «Гигиеническое нормирование лекарственных средств в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест и воде водных объектов», 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ» [5, 6]. Токсикологические эксперименты проводились на лабораторных животных (нелинейные самки белых крыс, исходная масса 180–220 г). Перед проведением исследований лабораторные животные проходили двухнедельный карантин в условиях вивария и содержались на стандартных рационах. Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя, при этом разность в массе тела животных составляла не более 10 %. При проведении исследований ежедневно наблюдали за общим состоянием и поведением животных, потреблением корма и воды.

Изучение биологических эффектов при повторном алиментарном поступлении фармацевтических субстанций циклофосфамида и золедроновой кислоты проводилось на белых крысах путем ежедневного 5 раз в неделю в течение 4 недель перорального введения лабораторным животным водного раствора, циклофосфамида и золедроновой кислоты в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг (1/10 от DL_{50}) соответственно; контрольной группе животных вводилась дистиллированная вода в эквивалентном объеме. В течение всего эксперимента проводили систематическое наблюдение за состоянием, поведением животных, потреблением ими корма и воды, отмечали возможные проявления токсичности, учитывали количество и сроки возможной гибели животных, регистрировали физиологические показатели. По окончании подострого эксперимента крыс выводили из эксперимента методом мгновенной декапитации, при этом собирали кровь из шейных сосудов; после вскрытия проводили макроскопию и определяли относительные коэффициенты масс (ОКМ) внутренних органов. Сыворотку крови отделяли от форменных элементов путем центрифугирования. Гемолизаты получали путем лизиса эритроцитов в дистил-

лированной воде или соответствующем буфере. Гемолизаты и пробы сыворотки крови исследовали немедленно после получения.

Для оценки токсического действия циклофосфида и золедроновой кислоты по окончании подострого эксперимента использовали комплекс общепринятых физиологических, общеклинических, гематологических и биохимических методов и тестов. Полученные результаты исследований подвергались статистической обработке с применением *U*-критерия Манна – Уитни.

Результаты и их обсуждение. Во время проведения эксперимента статистически значимых изменений со стороны физиологических по-

казателей (масса тела, суммационно-пороговой показатель, температура тела) по отношению к контрольной группе лабораторных животных выявлено не было как в группе животных, на которую воздействовал циклофосфамид, так и в группе действия золедроновой кислоты.

При ежедневном (5 раз в неделю) пероральном поступлении белым крысам циклофосфида были выявлены существенные статистически значимые изменения показателей периферического кровообращения. Так, содержание эритроцитов снизилось на 48 %, гемоглобина на 38 % и гематокрита на 32 % по отношению к контрольной группе лабораторных животных (таблица 1).

Таблица 1 — Показатели периферического кровообращения у белых крыс после 4-недельного перорального поступления циклофосфида и золедроновой кислоты в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг соответственно, Ме (P₂₅–P₇₅)

Показатель	Контроль	Циклофосфамид	Золедроновая кислота
Эритроциты, 10 ¹² /л	7,34 (7,11–7,66)	3,84 (2,91–6,06)*	7,90 (7,51–8,03)
Гемоглобин, г/л	144,00 (135,50–148,50)	90,00 (63,00–120,00)*	154,50 (149,50–160,00)*
Гематокрит	0,37 (0,36–0,40)	0,25 (0,22–0,34)*	0,42 (0,40–0,43)*
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	11,98 (10,18–15,41)	15,92 (12,73–20,83)	14,78 (13,81–15,22)
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	717,50 (569,50–802,50)	548,00 (437,00–645,00)	809,50 (614,50–944,00)
Объем эритроцита, 10 ⁻¹⁵ /л	51,90 (50,25–52,90)	65,80 (55,10–69,50)*	52,70 (51,40–55,30)
Объем тромбоцита, 10 ⁻¹⁵ /л	5,85 (5,65–6,00)	5,90 (5,70–6,10)	5,60 (5,50–5,70)
Концентрация гемоглобина в эритроците	376,50 (370,00–379,50)	341,00 (303,00–355,00)*	375,50 (370,00–379,00)
Гемоглобин в эритроците	19,45 (18,80–20,15)	21,00 (18,80–21,70)	20,05 (19,20–20,50)
Нейтрофилы, %	18,60 (17,25–19,80)	55,30 (27,10–69,00)*	22,80 (20,35–25,10)
Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	2,57 (1,84–2,94)	7,81 (4,52–11,52)*	3,53 (3,10–3,71)
Лимфоциты, %	71,20 (67,75–74,45)	34,20 (21,30–43,70)*	67,05 (65,65–72,05)
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	8,52 (6,86–11,08)	5,14 (3,34–7,12)	10,08 (8,25–10,20)
Моноциты, %	6,05 (4,55–8,90)	8,30 (8,00–19,30)	5,25 (4,70–6,10)
Моноциты, 10 ⁹ /л	0,76 (0,62–1,16)	1,50 (0,99–4,41)*	0,81 (0,65–0,89)
Эозинофилы, %	3,15 (2,20–4,30)	2,20 (1,30–4,00)	3,40 (2,70–4,30)
Эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,46 (0,27–0,61)	0,33 (0,21–0,50)	0,45 (0,38–0,64)
Базофилы, %	0,25 (0,20–1,00)	0,30 (0,10–0,50)	0,65 (0,35–0,80)
Базофилы, 10 ⁹ /л	0,03 (0,02–0,16)	0,05 (0,02–0,07)	0,10 (0,05–0,14)

* Статистически значимые изменения по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Кроме этого, циклофосфамид оказывал воздействие и на красный кровяной росток. Отмечалось статистически значимое увеличение объ-

ема эритроцита на 27 %, но при этом концентрация гемоглобина в эритроцитах снизилась на 9 % по отношению к контрольной группе.

Со стороны белого ростка кроветворения выявилось значительное статистически значимое увеличение как абсолютного, так и относительного количества нейтрофилов (в 3 раза) и абсолютного количества моноцитов (в 2 раза). На фоне этого у исследуемой группы лабораторных животных отмечалось снижение относительного количества лимфоцитов на 52 %. Указанные изменения позволяют заключить о способности циклофосфида вызывать анемические реакции у белых крыс в дозе 20 мг/кг при повторном пероральном введении, а также оказывать гемотоксическое действие как на красный, так и на белый росток кроветворения.

В отличие от циклофосфида золедроновая кислота в дозе 1/10 от DL₅₀ не обладает ярко выраженным гемотоксическим эффектом

при пероральном пути поступления. По окончании подострого эксперимента у исследуемой группы лабораторных животных отмечалось статистически значимое, однако не столь существенное увеличение содержания гемоглобина и показателя гематокрита на 7 и 14 % соответственно.

При проведении подострого исследования было установлено, что циклофосфамид в дозе, составляющей 1/10 от DL₅₀, способен вызывать выраженные изменения функциональных показателей мочевыделительной системы. Спустя 4 недели перорального введения циклофосфида белым крысам установлено значительное увеличение содержания фосфора в моче лабораторных животных в 2,25 раза, магния в 2,3 раза, белка в 3,7 раза и мочевины в 1,9 раз (таблица 2).

Таблица 2 — Показатели функционального состояния мочевыделительной системы у белых крыс после 4-недельного перорального поступления циклофосфида и золедроновой кислоты в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг соответственно, Ме (P₂₅–P₇₅)

Показатель	Контроль	Циклофосфамид	Золедроновая кислота
Фосфор в моче, мМоль/л	16,72 (7,50–19,09)	37,64 (36,00–47,57)*	17,93 (14,39–24,91)
Магний в моче, мМоль/л	0,61 (0,57–0,76)	1,39 (1,06–1,80)*	0,89 (0,60–1,23)
Белок в моче, г/л	2,50 (0,00–4,85)	9,20 (2,90–13,20)*	6,70 (3,25–9,65)
Альбумин в моче, мМоль/л	11,60 (11,00–12,60)	11,30 (11,20–11,80)	11,85 (10,60–13,15)
Креатинин в моче, мМоль/л	27,38 (17,01–32,55)	25,13 (19,99–43,28)	24,06 (20,55–26,81)
Мочевина в моче, мМоль/л	134,85 (112,51–142,59)	257,87 (217,80–265,07)*	175,48 (151,56–197,09)*
Глюкоза в моче, мМоль/л	1,11 (1,06–1,14)	1,23 (1,05–1,24)	1,13 (1,09–1,20)

* Статистически значимые изменения по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Повышенное содержание фосфора в моче после воздействия циклофосфида свидетельствует о дисфункции почек и возможной гиперкальциемии у лабораторных животных, которую подтверждает и снижение реабсорбции магния. Протеинурия и увеличение содержания мочевины в моче также позволяет сделать вывод о способности циклофосфида оказывать влияние на функциональное состояние почек и азотистый баланс организма лабораторных животных.

При повторном воздействии при пероральном введении в дозе 10 мг/кг золедроновая

кислота также обладает нефротоксическим действием, что подтверждается статистически значимым увеличением содержания мочевины в моче исследуемой группы животных в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой. Однако ее токсическое действие на органы мочевыделительной системы не так выражено по сравнению с воздействием циклофосфида.

При изучении биохимических показателей крови лабораторных животных было установлено, что циклофосфамид в дозе, составляющей 1/10 от среднесмертельной, оказывает комплексное токсическое действие практиче-

ски на все системы органов лабораторных животных. Так, в сыворотке крови белых крыс было выявлено статистически значимое снижение содержания креатинина на 16 %, альбуми-

на на 40 %, общего белка на 46 %, липопротеидов низкой и высокой плотности на 6 и 10 % соответственно, а также фосфора на 25 % (таблица 3).

Таблица 3 — Биохимические показатели крови у белых крыс после 4-недельного перорального поступления циклофосамида и золедроновой кислоты в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг соответственно, Ме (P₂₅–P₇₅)

Показатель	Контроль	Циклофосфамид	Золедроновая кислота
Глюкоза в крови, мМоль/л	5,75 (4,88–6,90)	5,44 (4,95–7,20)	6,44 (4,80–7,04)
Мочевина в крови, мМоль/л	10,29 (10,15–10,42)	9,56 (9,01–10,21)	9,44 (9,02–10,55)
Креатинин в сыворотке крови, мкМоль/л	41,03 (38,57–42,23)	34,67 (33,67–35,32)*	41,44 (39,83–44,10)
Альбумин в сыворотке крови, мМоль/л	42,45 (38,00–48,50)	25,35 (23,40–29,10)*	40,00 (24,60–53,00)
Общий белок в сыворотке крови, г/л	54,85 (50,05–64,35)	29,8 (24,8–42,00)*	71,9 (59,8–82,6)
Активность АЛТ сыворотки крови, мкМоль/л	0,11 (0,10–0,12)	0,1 (0,07–0,11)	0,12 (0,09–0,13)
Активность АСТ сыворотки крови, мкМоль/л	0,16 (0,13–0,16)	0,16 (0,14–0,22)	0,13 (0,13–0,17)
Билирубин в сыворотке крови, мкМоль/л	8,50 (7,15–10,55)	8,90 (7,20–9,70)	14,50 (9,60–16,40)*
ЛПНП в сыворотке крови, мМоль/л	2,90 (2,87–2,95)	2,74 (2,73–2,80)*	2,93 (2,88–2,95)
ЛПВП в сыворотке в крови, мМоль/л	0,77 (0,77–0,80)	0,69 (0,67–0,72)*	0,79 (0,74–0,82)
Фосфор в сыворотке крови, мМоль/л	1,71 (1,66–1,95)	1,28 (1,15–1,45)*	1,89 (1,52 –2,52)
Магний в сыворотке крови, мМоль/л	0,66 (0,62–0,71)	0,63 (0,58–0,65)	0,69 (0,57–0,73)
Амилаза в сыворотке крови, Ед/л	784,30 (516,45–824,15)	414,15 (391,10–455,30)*	597,70 (470,10–942,30)

* Статистически значимые изменения по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Снижение содержания общего белка, альбумина, креатинина и амилазы позволяет сделать вывод о комплексном цитотоксическом действии циклофосамида на организм лабораторных животных по окончании 4-недельного эксперимента. Снижение содержания липопротеидов указывает на дисфункцию почек, печени и на возможное тиреотоксическое действие циклофосамида. Увеличение экскреции фосфора с мочой, снижение его содержания в крови также подтверждает возможное патологическое действие на эндокринную систему орга-

низма и срыв адаптационных резервов белых крыс по окончании подострого эксперимента.

При изучении биохимических показателей крови после перорального введения золедроновой кислоты в дозе 1/10 от DL₅₀ было выявлено статистически значимое увеличение только одного показателя у лабораторных животных, а именно, содержания билирубина в сыворотке крови в 1,7 раз, что может свидетельствовать о незначительном гепатотоксическом действии данной фармацевтической субстанции на организм белых крыс.

По окончании подострого эксперимента было проведено макроскопическое патоморфологическое исследование внутренних орга-

нов с их взвешиванием на аналитических весах и расчетом ОКМ внутренних органов (таблица 4).

Таблица 4 — Относительные коэффициенты массы внутренних органов у белых крыс после 4-недельного перорального поступления циклофосфамида и золедроновой кислоты в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг соответственно, Ме (P₂₅–P₇₅)

Показатель	Контроль	Циклофосфамид	Золедроновая кислота
ОКМ печени, кг ⁻³ /кг	34,29 (32,83–35,10)	38,99 (33,67–47,37)	35,68 (34,16–36,72)
ОКМ сердца, кг ⁻³ /кг	3,10 (2,77–3,37)	4,08 (3,82–4,21)*	3,41 (3,08–4,04)
ОКМ селезенки, кг ⁻³ /кг	5,14 (4,37–6,05)	7,04 (5,44–8,11)*	4,46 (3,73–6,05)
ОКМ почек, кг ⁻³ /кг	7,32 (6,78–7,94)	8,59 (8,16–9,41)*	8,14 (7,62–8,50)
ОКМ легких, кг ⁻³ /кг	7,74 (7,16–8,29)	13,99 (11,47–16,05)*	7,86 (6,70–8,71)

При проведении патоморфологического исследования внутренних органов лабораторных животных после 4-недельного перорального поступления в дозе 20 мг/кг циклофосфамида было выявлено статистически значимое увеличение относительных коэффициентов масс сердца, селезенки, почек и легких в 1,32, 1,37, 1,17 и 1,8 раз соответственно, что позволяет установить выраженное токсическое действие исследуемой субстанции на весь организм белых крыс. При этом наблюдается срыв адаптационных возможностей у лабораторных животных.

По окончании эксперимента статистически значимых изменений относительных коэффициентов масс внутренних органов лабораторных животных после перорального поступления золедроновой кислоты в дозе 10 мг/кг выявлено не было.

Заключение. Таким образом, по комплексу физиологических, общеклинических, гематологических и биохимических методов и тестов установлено, что циклофосфамид при подо-

стром алиментарном поступлении в дозе 20 мг/кг оказывает биологический эффект на уровне целостного организма лабораторных животных и обладает гемотоксическим, гепатотоксическим, нефротоксическим действиями, а также приводит к срыву адаптационных резервов у лабораторных животных. Золедроновая кислота при алиментарном поступлении в дозе 10 мг/кг оказывает менее выраженные биологические эффекты, однако способна вызывать определенные изменения со стороны печени, почек и крови лабораторных животных.

Так как случаев гибели лабораторных животных в течение всего эксперимента не было выявлено, то рассчитать коэффициент кумуляции и установить материальное кумулятивное действие нельзя, однако по комплексу указанных выше изменений можно установить, что циклофосфамид и золедроновая кислота в дозах 20 мг/кг и 10 мг/кг, соответственно, способны оказывать функциональное кумулятивное действие на организм лабораторных животных.

Список цитированных источников

1. Cancer incidence in five continents. Vol. VIII / eds.: D. M. Parkin [et al.]. — Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2002. — 838 p. : tab. — (IARC Scientific Publication ; № 155).
2. World Cancer Report / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer / eds.: B. W. Stewart, P. Kleihues. — Lyon : IARC Press, 2003. — 351 p.
3. Boyle, P. Cancer incidence and mortality in Europe. 2004 / P. Boyle, J. Ferlay // Ann. Oncol. — 2005. — Vol. 16, № 3. — P. 481–488.
4. Надлежащая лабораторная практика : ТКП 125-2008 (02040) // М-во здравоохран. Респ. Беларусь. — Минск : РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении», 2008. — 34 с. — Введ. 01.05.2008.
5. Гигиеническое нормирование лекарственных средств в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест и воде водных объектов : инструкция 1.1.11-12-206-2003 // Сб. санитарных правил и норм по коммунальной гигиене / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. — Минск, 2005. — Ч. 2. — С. 13–63.
6. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ : инструкция 1.1.11-12-35-2004 / М-во здравоохран. Респ. Беларусь. — Минск, 2004. — 43 с.



Features of the biological action of cyclophosphamide and zoledronic acid in a subacute experiment

Liapioshka P. N.¹, Sobal Y. A.², Siamionau I. P.¹

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

²State institution "Scientific and Practical Center of the State Committee of Forensic Examinations of the Republic of Belarus", Minsk, Republic of Belarus

The results of a subacute experiment with oral administration of aqueous solutions of active ingredient cyclophosphamide and zoledronic acid to laboratory animals are presented. It has been established that cyclophosphamide has pronounced biological effects on white rats and lead to disruption of adaptive capabilities of the animal organism. Zoledronic acid caused less pronounced biological responses, which were characterized by hemotoxic and nephrotoxic effects.

Keywords: Toxicology, cyclophosphamide, zoledronic acid, subacute experiment, biological effect.

Поступила 27.09.2022