

# ТОКСИКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

## ГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ НЕКОТОРЫХ СХЕМ КОМБИНИРОВАННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ С ВКЛЮЧЕНИЕМ АРАНОЗЫ

В. С. Покровский<sup>1</sup>, М. И. Трещалин<sup>2</sup>, Д. А. Бодягин<sup>2</sup>, Е. М. Трещалина<sup>1</sup>

На здоровых мышах исследована гематологическая токсичность четырех комбинаций с включением аранозы (*Ar*), цисплатина (*P*), этопозиды (*E*), иринотекана (*I*) и топотекана (*T*) *TAr*, *TPAr*, *EPAr* и *IPAr* в терапевтических режимах в сравнении с *Ar* в высокой терапевтической дозе. Показано, что *Ar* в изученном режиме применения вызывает раннюю лейкопению, в основном, за счет лимфоцитопении, сменяющуюся абсолютным и относительным нейтрофилезом. *TAr* вызывает умеренную нейтропению, а тройные комбинации — умеренную лимфоцитопению. Среди тройных комбинаций сравнительно большей гематологической токсичностью обладает *TPAr*. Общее количество эритроцитов и тромбоцитов в периферической крови под действием *Ar* и изученных комбинаций остается на уровне контрольных значений. Включение *Ar* в указанные схемы не приводит к изменению спектра или усилению гематотоксических эффектов. Выявленные изменения периферической крови обратимы и не сопровождаются ухудшением состояния мышей, что позволяет считать комбинации с использованием *P*, *E*, *I*, *T* и *Ar* перспективными для дальнейшего изучения.

**Ключевые слова:** мыши, гематологическая токсичность, периферическая кровь, араноза, цисплатин, этопозид, иринотекан, топотекан

### ВВЕДЕНИЕ

Для противоопухолевых препаратов из группы нитропроизводных мочевины гематологическая токсичность является лимитирующей. Наиболее грозные ее проявления — фебрильная нейтропения и тромбоцитопения. Отечественный препарат этого ряда араноза, представляющая 3- $\alpha$ -L-арабинопиранозил-1-метил-1-нитрозомочевину, по клиническим данным относительно мягко угнетает кроветворение и вызывает только умеренную миелосупрессию [9, 11]. Согласно экспериментальным данным, однократное внутрибрюшинное введение аранозы мышам в МПД вызывает выраженную лейкопению с существенными изменениями лейкоцитарной формулы: сначала отмечается нейтропения, которая сменяется нейтрофилезом на фоне выраженного угнетения лимфоидного кроветворения [2]. Восстановление кроветворения происходит медленно, причем даже спустя 42 сут сохраняются изменения лейкоцитарной формулы [4].

Несмотря на то что араноза используется достаточно давно, ее эффективность в современных схемах полихимиотерапии изучена недостаточно. Показана, например, эффективность комбинаций с цисплатином, винкристином, доксорубицином и некоторыми иммунотерапевтическими препаратами [3, 7].

Для расширения показаний к применению препарата нами были изучены новые двойные и тройные комбинации с включением *Ar*, *P*, *E*, *I* или *T*, ориентированные на лечение мелкоклеточного рака легкого. Все схемы оказались высокоэффективными на модели перививаемой карциномы легкого Льюис мышей и относительно малотоксичными. Единственным признаком токсичности было уменьшение массы селезенки, расцененное как потенциальная гематологическая токсичность [5, 6, 12]. Для уточнения этого предположения предпринято исследование гематотоксичности указанных схем на здоровых мышах.

Целью исследования было сравнительное изучение гематологической токсичности комбинаций *TAr*, *EPAr*, *IPAr* и *TPAr* в терапевтических режимах применения в сравнении с *Ar*; введенной троекратно в высокой терапевтической дозе.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Животные.** В опытах использовали мышей-самок *BALB/c* массой тела 18 – 22 г из разведения РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. Животных содержали в виварии НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН с естественным освещением на брикетированном корме и свободном доступе к воде. Перед введением препаратов животных распределяли на группы ( $n = 5$ ), одной группе мышей препараты не вводили и считали контрольной.

**Препараты.** *Ar* (“Глэс”, РФ) вводили в 1% растворе троекратно в разовых дозах 100 мг/кг (в комбинациях)

<sup>1</sup> РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва, 115478, Каширское ш., 24.

<sup>2</sup> НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН, Москва.

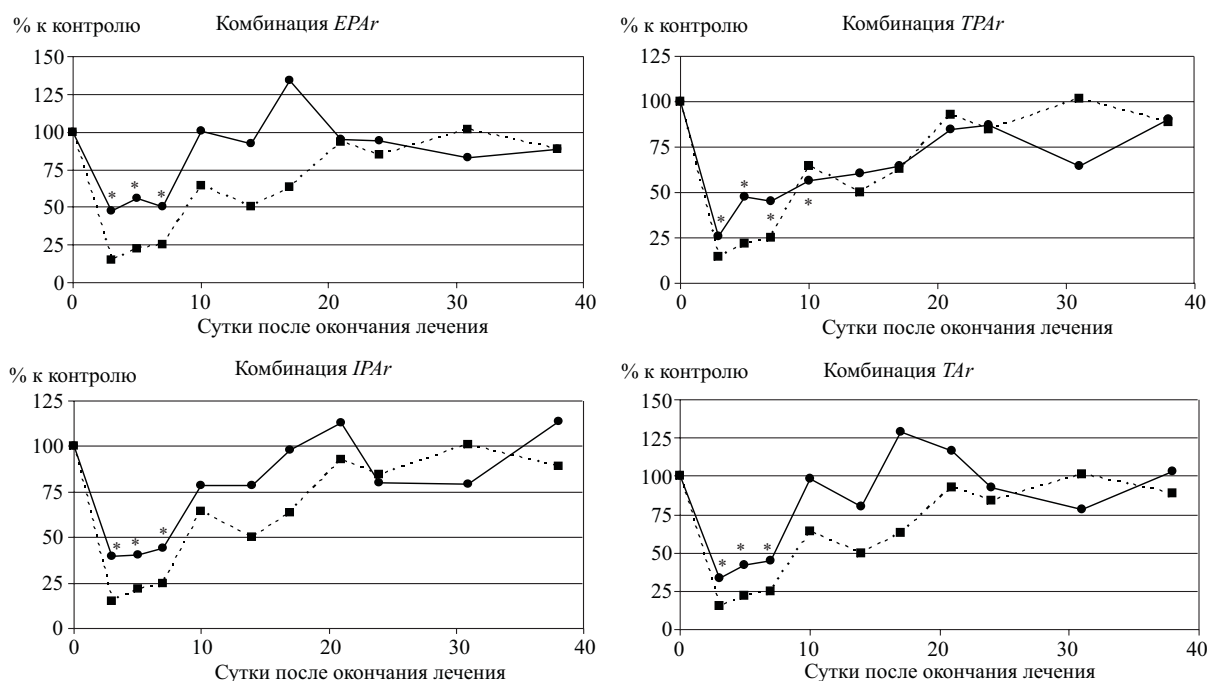


Рис. 1. Содержание лейкоцитов в периферической крови мышей после введения препаратов в комбинациях EPar, IPar, TPar, TAr в сравнении с Ar (обозначена пунктирной линией), звездочкой обозначены значимые ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю измерения.

или 200 мг/кг (в монотерапии), суммарные дозы 300 и 600 мг/кг соответственно. P (“Ebeve”, Польша) вводили в 0,025 % растворе троекратно в разовой дозе 2 мг/кг (суммарная доза 6 мг/кг). E (“Teva”, Нидерланды) вводили в 0,1% растворе троекратно в разовой дозе 5 мг/кг (суммарная доза 15 мг/кг). I (“Teva”, Аргентина) вводили в 0,6% растворе однократно (в 1-е сутки) в разовой дозе 30 мг/кг. T (“Glaxo Smith Kline”, Великобритания) вводили в 0,008% растворе троекратно в разовых дозах 0,5 мг/кг (в комбинации TPar) или 0,75 мг/кг (в комбинации TAr), суммарные дозы 1,5 и 2,25 мг/кг соответственно.

Препараты вводили внутривенно ежедневно на 1–3-и сутки опыта в указанной последовательности: T-Ar; E-P-Ar; I-P-Ar; T-P-Ar с интервалом 5–10 мин. Растворитель для E, P, I и T — 0,9% раствор натрия хлорида, для Ar — 5% раствор глюкозы. Используемые дозы были ранее нами охарактеризованы в химиотерапевтических экспериментах как эффективные.

**Оценка гематологической токсичности.** Проведена по стандартной методике с определением гематологических показателей периферической крови здоровых мышей и оценкой других значимых критериев. Учитывая характер гематологической токсичности аранозы, взятие крови из хвостовой вены выполняли в течение 38 суток (день 0 (фон), 3, 5, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 31 и 38-е сутки после введения). Общее количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитарную формулу определяли при помощи автоматического гематологического анализатора *Abacus Junior vet* (Австрия). Для морфологического исследования клеток пе-

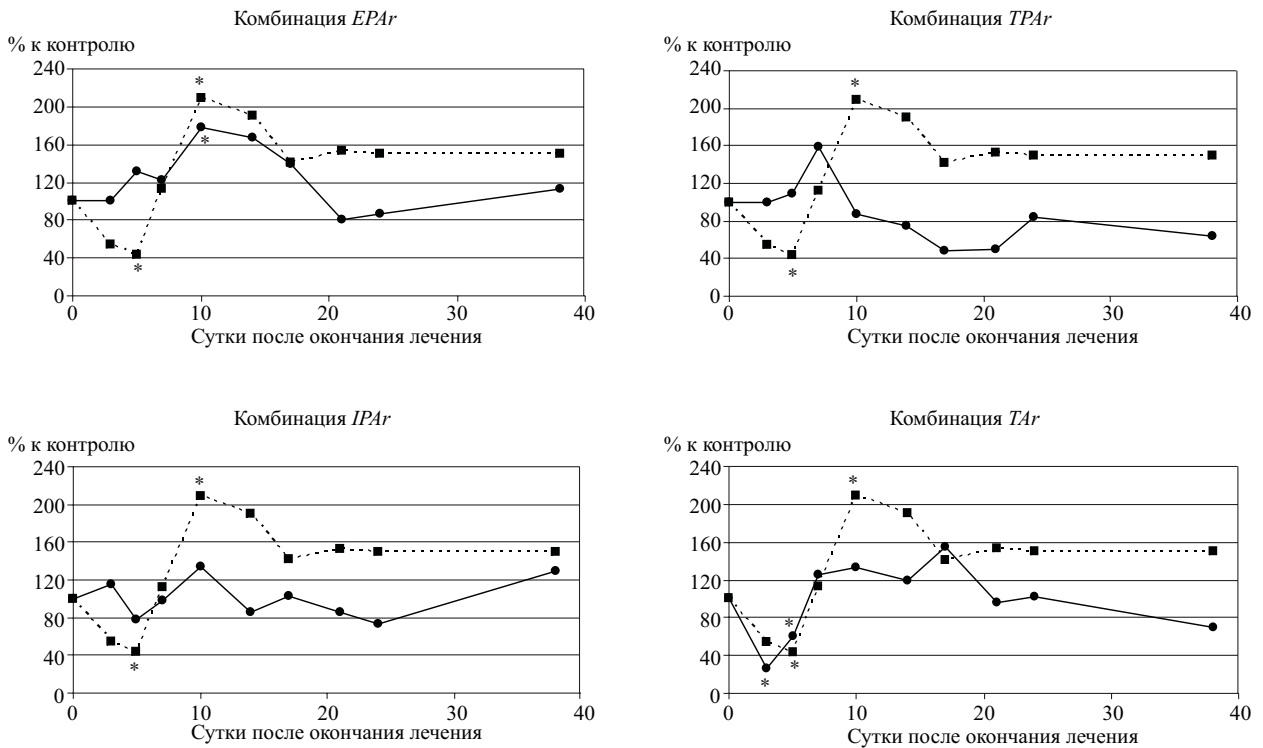
риферической крови проводили микроскопическое исследование мазков после фиксации в метаноле и окраски азур II — эозином. Кроме того, оценивали концентрацию гемоглобина, гематокрит, эритроцитарные индексы, тромбоциты и средний объем тромбоцитов.

**Завершение эксперимента.** Мышей декапитировали, после чего выделяли селезенку, которую взвешивали на торсионных весах с ценой деления 20 мг и определяли массу органа, затем рассчитывали массовые коэффициенты.

**Статистическая обработка.** Полученные данные подвергали статистической обработке по методу Фишера-Стьюдента с использованием  $t$ -критерия. Глубину и продолжительность патологических изменений периферической крови и массы селезенки у мышей, получивших комбинации препаратов, сравнивали с аналогичными показателями контрольной группы и группы животных, получивших Ar. Значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика изменения общего количества лейкоцитов во всех группах представлена на рис. 1. Исходный средний уровень лейкоцитов во всех группах составлял  $7,72 \cdot 10^9$ /л. После троекратного введения 200 мг/кг Ar (суммарная доза 600 мг/кг) отмечали 2 пика лейкоцитопении — на 3–7-е сутки, а также небольшое снижение количества лейкоцитов на 14-е сутки. Показано, что на 3-и сутки общее количество лейкоцитов снижается по сравнению с контролем в 7 раз (составляя 15% от контрольного значения), после чего на-



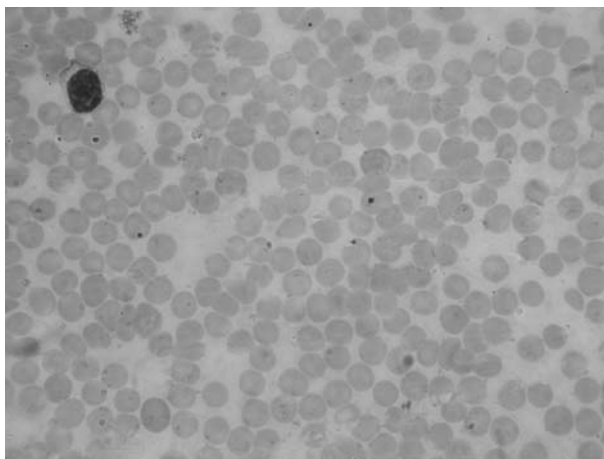
**Рис. 2.** Содержание нейтрофилов в периферической крови мышей после введения препаратов в комбинациях *EPar*, *IPAr*, *TPAr*, *TAr* в сравнении с *Ar* (обозначена пунктирной линией), звездочкой обозначены значимые ( $p < 0,05$ ) по отношению к контролю измерения.

чинает медленно восстанавливаться: 63% к 17-м суткам и 93% — к 21-м суткам.

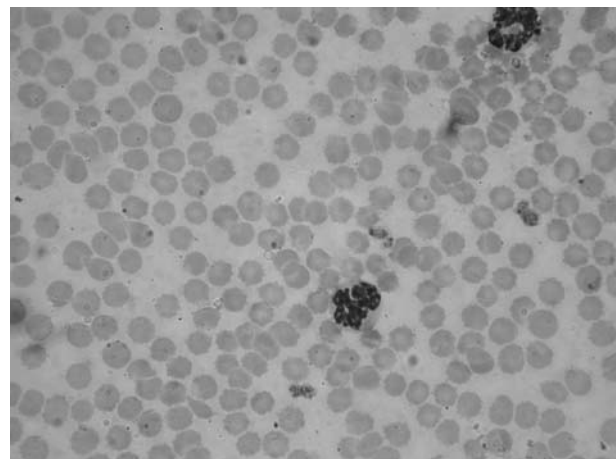
В группах комбинированного воздействия глубина лейкоцитопении на 3–7-е сутки после окончания введения препаратов была достоверно ( $p < 0,05$ ) меньше, чем при монотерапии *Ar* (26–55% от контрольных значений), при этом в группах *EPar* и *TAr* отмечали более быстрое восстановление количества лейкоцитов (к 10-м суткам). После применения *IPAr* общее количество лейкоцитов восстанавливалось только к 17-м суткам. Наиболее глубокая и длительная лейкоцитопения

наблюдалась после введения *TPAr*. Так, количество лейкоцитов на 3-и сутки снизилось в 4 раза (26% от контрольного значения) и было достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже, чем в группе *EPar*. На 17-е сутки количество лейкоцитов составило 64%, что достоверно ниже ( $p < 0,05$ ) уровня лейкоцитов при применении *EPar*, *IPAr* и *TAr*. Восстановление наблюдали только к 21-м суткам. Таким образом, наиболее длительная лейкоцитопения наблюдалась в группе *TPAr*.

Анализ формулы крови показал, что общее количество лейкоцитов после введения *Ar* снижается, глав-



*a*



*b*

**Рис. 3.** Картина периферической крови на 10-е сутки после окончания введения *Ar* 200 мг/кг троекратно (*b*) в сравнении с контрольной группой (*a*).

ным образом, за счет лимфоцитов, в то время как количество нейтрофилов после некоторого снижения на 3–5-е сутки увеличивается до 208% ( $p < 0,05$ ) от контрольного значения на 10-е сутки (рис. 2). При применении комбинаций *EPAr*, *IPAr* и *TPAr* достоверного снижения количества нейтрофилов отмечено не было. Более того, на 10-е сутки в группе *EPAr* было зафиксировано достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение количества нейтрофилов на 78% по сравнению с контролем. Наиболее резкое снижение количества нейтрофилов было выявлено при использовании *TAr*: на 3-и сутки оно достоверно ( $p < 0,05$ ) снизилось более чем в 3 раза по сравнению с контрольной группой (27%). Однако к 7-м суткам оно также восстанавливалось.

Другие исследованные показатели (гемоглобин, гематокрит, эритроцитарные индексы, тромбоциты и др.) на протяжении всего срока наблюдения существенно не изменялись.

В настоящей работе изучено действие на периферическую кровь схем комбинированной химиотерапии с включением *Ar*; разработанных для лечения рака легкого в эксперименте [5, 6, 12]. В результате проведенного исследования показано, что все изученные комбинации и *Ar* при трехкратном введении в высокой терапевтической дозе не вызывают глубокой нейтропении и не влияют на эритроцитарный и тромбоцитарный ростки.

*Ar* в использованном режиме вызывает длительную глубокую лейкоцитопению, преимущественно за счет угнетения лимфоидного ростка кроветворения. Влияние на миелоидный росток при этом незначительно и кратковременно, а начиная с 10-х суток выявляется даже его стимуляция, что согласуется с данными других авторов, полученными при других режимах применения препарата [4]. Следует подчеркнуть, что у пациентов, имеющих миелоидный тип кроветворения, применение *Ar* (даже в сочетании с другими препаратами, обладающими гематологической токсичностью) редко приводит к выраженным нарушениям кроветворения [3, 11].

Несмотря на отсутствие изменений количества эритроцитов в периферической крови, а также эритроцитарных индексов, при детальном микроскопическом изучении мазков крови всех мышей, получивших *Ar* трехкратно в разовой дозе 200 мг/кг, были найдены эритроциты измененной шиповатой формы, напоминающие акантоциты (рис. 3). В группах мышей, получивших комбинации препаратов, видоизмененные эритроциты встречались значительно реже. У мышей контрольной группы такие формы не встречались. Учитывая отсутствие изменений эритроцитарных индексов, можно предположить, что данный феномен связан с изменением стабильности клеточной мембраны эритроцитов под воздействием препарата. Однако это требует дальнейшего изучения.

Схема *EPAr* в использованных дозах демонстрирует относительно мягкую и кратковременную гематологи-

ческую токсичность, что было достигнуто применением низкой терапевтической дозы *E* (примерно 1/4 МПД). При увеличении дозы *E* существует опасность увеличения гематотоксичности за счет, главным образом, угнетения лимфоидного кроветворения [1]. Учитывая выраженную лейкоцитопению при клиническом применении *EP*, для снижения риска гематологической токсичности *EPAr* целесообразно провести коррекцию доз препаратов [8].

*IPAr* в использованных дозах представляется наименее токсичной комбинацией, что, вероятно, обусловлено незначительной гематологической токсичностью *I*, выявленной в эксперименте [1]. Тем не менее наличие дозолIMITИРУЮЩЕЙ гематологической токсичности *IP* в клинике также диктует необходимость осторожного подбора доз препаратов [10].

*TPAr* в изученных дозах обладает максимальной гематологической токсичностью, сопоставимой с таковой при монотерапии *Ar*. Для снижения гематологической токсичности целесообразно изучить другие режимы применения комбинации.

*TAr* представляется одной из наиболее перспективных комбинаций благодаря неглубокой и кратковременной лейкоцитопении. Учитывая незначительное угнетение миелоидного кроветворения при применении *Ar* в клинике, такое сочетание препаратов может оказаться эффективным и малотоксичным [7, 11].

## ВЫВОДЫ

1. Араноза при трехкратном введении в высокой терапевтической дозе (200 мг/кг, суммарная доза 600 мг/кг) вызывает раннюю лимфоцитопению, сменяющуюся абсолютным нейтрофилезом.
2. Комбинации *EPAr*, *IPAr*, *TPAr*, *TAr* или араноза в монотерапии не влияют на общее количество эритроцитов и тромбоцитов.
3. Гематологическая токсичность комбинаций *EPAr*, *IPAr*, *TPAr*, *TAr* в изученных дозах меньше, чем при применении аранозы в высокой дозе.
4. Из изученных комбинаций *TPAr* вызывает наиболее длительную и глубокую лейкоцитопению, *TAr* вызывает умеренную нейтропению.

Авторы выражают благодарность сотрудникам НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН Э. Р. Переверзевой и И. Д. Трещалину за помощь в проведении экспериментов и трактовке результатов исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Г. В. Карпова, Е. В. Абрамова, Т. И. Фомина и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, № 1, 42–47 (2006).
2. В. В. Клеянкина, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Москва (1980).
3. А. Е. Кузьминов, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Москва (2007).
4. Н. А. Лесная, Н. А. Харьковская, С. А. Хрусталева, *Химиотерапия опухолей в СССР*, вып. 57, 194–197 (1991).

5. В. С. Покровский, Н. А. Лесная, В. И. Романенко, Е. М. Трещалина, *Росс. биотер. ж.*, № 2, 14 (2009).
6. В. С. Покровский, Н. А. Лесная, В. И. Романенко, Е. М. Трещалина, *Сибирский онкол. ж.*, Приложение № 1, Матер. IV региональной конф. молодых ученых-онкологов им. Н. В. Васильева, 159 (2009).
7. Д. Ю. Харкевич, Г. Н. Егоров, Л. В. Манзюк, Л. В. Демидов, *Росс. биотер. ж.*, № 1, 72 – 76 (2004).
8. J. R. Eckardt, J. von Pawel, Z. Papai, et al., *J. Clin. Oncol.*, **24**, 2044 – 2051 (2006).
9. L. B. Gorbacheva, G. V. Kukushkina, T. A. Elknes, et al., *Int. J. Exp. Clin. Chemother.*, № 1, 1 – 7 (1993).
10. S. Kudoh, Y. Fujiwara, Y. Takada, et al., *J. Clin. Oncol.*, **16**, 1068 – 1074 (1998).
11. N. I. Perevodchikova, V. A. Gorbunova, N. F. Orel, et al., *Int. J. Exp. Clin. Chemother.*, № 4, 231 – 236 (1992).
12. V. S. Pokrovsky, N. A. Lesnaya, V. I. Romanenko, H. M. Treshalina, *Abstract Book of 20<sup>th</sup> Int. Congr. of Anti-Cancer Treatment*, 379 (2009).

Поступила 06.08.09

## HEMATOLOGICAL TOXICITY OF SOME COMBINED CHEMOTHERAPY SCHEMES INVOLVING ARANOSE

V. S. Pokrovskii<sup>1</sup>, M. I. Treshchalin<sup>2</sup>, D. A. Bodyagin<sup>2</sup>, and E. M. Treshchalina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Blokhin Oncological Research Center, Kashirskoe Shosse 24, Moscow, 115478, Russia

<sup>2</sup> Gauze Institute for New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Bol'shaya Pirogovskaya 11, Moscow, 119867, Russia

Hematological toxicity of four combined chemotherapy schemes – *TAr*, *TPAr*, *EPAr*, and *IPAr* — involving aranose (*Ar*), cisplatin (*P*), etoposide (*E*), irinotecan (*I*), and topotecan (*T*) in therapeutic regimes has been studied on healthy mice in comparison to the treatment with *Ar* in a high therapeutic dose. It is established that *Ar* alone induces early leucopenia, mostly as a result of lymphocytopenia followed by the absolute and relative neutrophilia; the *TAr* treatment leads to a moderate neutropenia; whereas the ternary combinations cause a moderate lymphocytopenia. A relatively high hematological toxicity among the ternary combinations was observed for *TPAr*. The total number of erythrocytes and thrombocytes in the peripheral blood of mice under the action of *Ar* and all combinations remains on the control level. The inclusion of *Ar* into the indicated schemes neither modifies the spectrum of hematological toxicity nor increases its level. The observed changes in the peripheral blood were reversible and were not accompanied by any impairment in the state of mice. The obtained results allow the combinations involving *P*, *E*, *I*, *T*, and *Ar* to be considered as promising for further investigation.

**Key words:** Mice, hematological toxicity, peripheral blood, aranose, cisplatin, etoposide, irinotecan, topotecan