

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

МИЕЛОТОКСИЧНОСТЬ ПАКЛИТАКСЕЛА (МИТОТАКС)

Г. В. Карпова, Т. И. Фомина, О. Л. Воронова, Е. В. Абрамова,
Е. А. Тимина, Т. Ю. Ламзина, Л. А. Ермолаева, А. В. Перова¹

Паклитаксел (митотакс) при внутривенном введении однократно в максимально переносимой дозе (4,6 мг/кг) белым беспородным крысам вызывает в костном мозге в первые часы исследования увеличение содержания митозов клеток гранулоцитарного и эритроидного ростков при переходе из метафазы к анафазе, развитие гипоплазии: снижение содержания незрелых и зрелых гранулоцитов, эритронормобластов, лимфоцитов. В периферической крови наблюдается развитие умеренной панцитопении: гипопластической анемии, кратковременной глубокой нейтропении, умеренной лимфоцитопении и тромбоцитопении. На препаратах костного мозга у мышей через 24 ч выявлено значительное увеличение процента полиплоидных (4n) клеток и умеренное — структурных изменений хромосом в метафазных пластинках за счет хроматидных разрывов. Введение препарата приводило к раннему увеличению числа митозов клеток тимуса, содержания тимоцитов с признаками апоптоза, умеренному снижению массы тимуса и селезенки. Изменения носят обратимый характер. В поздние сроки исследования (90 сут) отмечается ускоренная возрастная инволюция тимуса, снижение содержания лимфоцитов в периферической крови и костном мозге.

Ключевые слова: паклитаксел (митотакс), периферическая кровь, костный мозг, лимфоидные органы

ВВЕДЕНИЕ

Внимание онкологов привлекают препараты группы таксанов (паклитаксел, доцетаксел) — противоопухолевые агенты природного происхождения, действующие на цитоплазматические мишени (микротрубочки). Таксаны нарушают динамическое равновесие между основными ингредиентами микротубулярного аппарата — α и β тубулинами и препятствуют делению клеток. Таксаны являются фазоспецифическими (митогенными) цитостатиками, действующими на клетки опухоли в G₂/M фазе клеточного цикла. Кроме того, они обладают способностью усиливать противоопухолевый эффект за счет антиангиогенного воздействия и увеличения апоптоза клеток опухоли [2, 5, 8, 10, 11].

В клинической практике таксаны применяют в режиме монотерапии или в комбинации с цисплатином (раке яичников, немелкоклеточный рак легких) или с доксорубицином (рак молочной железы). Наиболее важными побочными проявлениями химиотерапии таксанами являются миелотоксичность (нейтропения, тромбоцитопения и анемия), нейротоксичность, кардиотоксичность, гиперчувствительность к препарату [1, 5, 8, 9, 12].

В настоящей работе представлены результаты экспериментального изучения ранних и отдаленных реакций кроветворных и лимфоидных органов крыс на

введение паклитаксела (paclitaxel), выпускаемого компанией “Dr. Reddy’s Laboratories Ltd”. (Индия) под названием митотакс [1].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 59 белых конвенциональных нелинейных крысах-самках исходной массой 200 – 250 г и 20 мышях линии СВА массой 18 – 20 г, полученных из коллекционного фонда лаборатории экспериментального биомоделирования ГУ НИИ фармакологии Томского научного центра СО РАМН (сертификат имеется). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). До и в период эксперимента животные находились в виварии при температуре воздуха 20 – 23° С, влажности не более 50 %, объем воздухообмена (вытяжка : приток) — 8:10; в световом режиме день-ночь (1:1), в стандартных пластиковых клетках фирмы VELAZ размером 35 × 57,5 × 18,5 см для крыс и 42 × 25 × 14 см для мышей с мелкой древесной стружкой по 5 и 10 особей соответственно в каждой, в открытой системе, на стандартном рационе.

Митотакс (паклитаксел) вводили крысам внутривенно однократно в максимально переносимой дозе (МПД) 4,6 мг/кг, установленной методом графического пробит-анализа при наблюдении в течение 30 дней. Контрольную группу составили животные, которым

¹ ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск, 634034, просп. Ленина, 3.

внутривенно вводили в эквиваленте растворитель (физиологический раствор). У всех крыс (4 – 5 животных в группе) в ранние сроки (через 1, 2, 4, 6 и 8 ч, на 2, 5, 10, 15, 30-е сутки) и поздние сроки (через 90 сут) в периферической крови, взятой из хвоста после ампутации его кончика (25 мкл), определяли показатели форменных элементов на автоматическом гематологическом анализаторе Abacus (“Diatron”, Австрия) в ветеринарном режиме [4]. Оценивали следующие показатели гемограммы: концентрацию гемоглобина (HGB, г/л), количество эритроцитов (RBC, 10^{12} /л), гематокрит (HCT, %), содержание тромбоцитов (PLT, 10^9 /л), общее число лейкоцитов (WBC, 10^9 /л), лейкограмму. Ретикулоциты подсчитывали в мазке крови при суправитальной окраске бриллиантовым крезиловым синим [4]. После умерщвления животных (дислокация шейных позвонков под эфирным наркозом) исследовали показатели костного мозга (общее количество клеток — ОКК, показатели миелограммы, 10^6 /бедро), морфологию тимуса на гистологических препаратах (фиксация в жидкости Карнуа, окраска гематоксилином и эозином гистологических препаратов [6]), а также массу тимуса и селезенки (в мг) и их цитограмму (в %). Для морфологического исследования клеток периферической крови, костного мозга, тимуса и селезенки (лейкограмма, миелограмма, тимограмма, спленограмма) проводили микроскопическое исследование цитологических препаратов, окрашенных комбинированно фиксатором-красителем Май-Грюнвальда и азур II-эозином по Нохту [4]. Кроме того, на цитологических препаратах тимуса подсчитывали процент клеток с апоптозными изменениями (пикноз, фрагментоз, маргинация ядра, выплывание апоптозных тел и др.) [3]. У мышей линии СВА для оценки цитогенетических нарушений через 24 ч после введения митотакса в дозе 4,6 мг/кг исследовали состояние хромосом метафазных пластинок костного мозга (содержание поврежденных метафаз, число aberrаций хромосом, хроматидных фрагментов и обменов на 100 клеток, а также регистрировали клетки с пробелами) по модифицированному методу Форда [7].

Результаты обрабатывали с использованием критерия Стьюдента и Вилкоксона-Манна-Уитни. Данные приводятся в виде $X \pm m$, где X — среднее арифметическое, m — её стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показателей периферической крови и костного мозга у крыс после внутривенного введения митотакса в дозе 4,6 мг/кг представлены на рис. 1 и 2.

Со стороны периферической крови у крыс (рис. 1) в первые часы после воздействия средние величины показателей красной крови существенно не отличались от их значений у животных контрольной группы. Через 6 и 8 ч опыта наблюдался лейкоцитоз за счет уве-

личения (около 500 % от контроля) содержания нейтрофильных гранулоцитов, что характерно для раннего периода неспецифической стресс-реакции. Число лимфоцитов снижалось, составляя через 8 ч около 50 % от контроля. Затем (с 24 ч до 15 сут опыта) наблюдалось развитие умеренной гипорегенераторной анемии (снижалось содержание эритроцитов, гемоглобина, ретикулоцитов и гематокритное число). Со стороны белой крови в этот период исследования общее число лейкоцитов существенно не изменялось, но отмечалось развитие кратковременной (на 5-е сутки опыта) глубокой нейтропении, среднее значение числа зрелых нейтрофилов составило 26 ± 9 % от контроля. Отмечалось развитие умеренной обратимой тромбоцитопении.

Исследование костного мозга выявило в первые часы исследования (максимально через 4 – 6 ч) увеличение содержания митозов клеток гранулоцитарного и эритроидного ростков при переходе из метафазы к анафазе (рис. 2, *г, е*) и развитие гипоплазии (максимально на 5-е сутки опыта): снижение общей клеточности (рис. 2, *а*), содержания незрелых и зрелых гранулоцитов (рис. 2, *б, в*), эритронормобластов (рис. 2, *д*), лимфоцитов (рис. 2, *ж*).

На цитогенетических препаратах костного мозга у мышей через 24 ч после введения митотакса в дозе 4,6 мг/кг значительно возрастал процент полиплоидных ($4n$) клеток ($17,2 \pm 0,9$ %, в контроле — 0, $p < 0,001$). Наблюдалось умеренное увеличение структурных изменений хромосом в метафазных пластинках ($5 \pm 1,6$ %, в контроле 1 %, $p < 0,05$) за счет хроматидных разрывов ($4,5 \pm 1,5$ %, в контроле 1 %, $p < 0,05$).

При исследовании лимфоидных органов у животных опытных групп наблюдалось снижение массы тимуса и селезенки (таблица), максимально на 5-е сутки, в тимограмме крыс выявлено снижение процента незрелых тимоцитов (больших и средних их форм). В ранние сроки (1 – 6 ч) после введения митотакса возрастало число митозов при переходе из метафазы к анафазе (рис. 2, *з, 1*). В этот период исследования на цитологических препаратах тимуса увеличивалось число тимоцитов с признаками апоптоза (клетки с карипикнозом, карioreксисом, маргинацией хроматина, выплыванием апоптозных тел — мембранозамкнутых фрагментов и др.), (рис.2, *з, 2*).

На гистологических препаратах тимуса в первые сутки отмечалось гнездное исчезновение лимфоцитов из коркового вещества. Через 24 ч в мозговом веществе появлялись крупные (образованные 10 и более эпителиальными клетками) тельца Гассала с ороговением и тельца Гассала в виде эпителиальных кист, содержащих клеточный детрит. На 5-е сутки уменьшалась клеточность корковой и мозговой зон, обнажался эпителий стромы. У некоторых крыс, получавших митотакс, стиралась разница между корковой и мозговой зонами. На 10-й день эксперимента клеточность зон тимуса

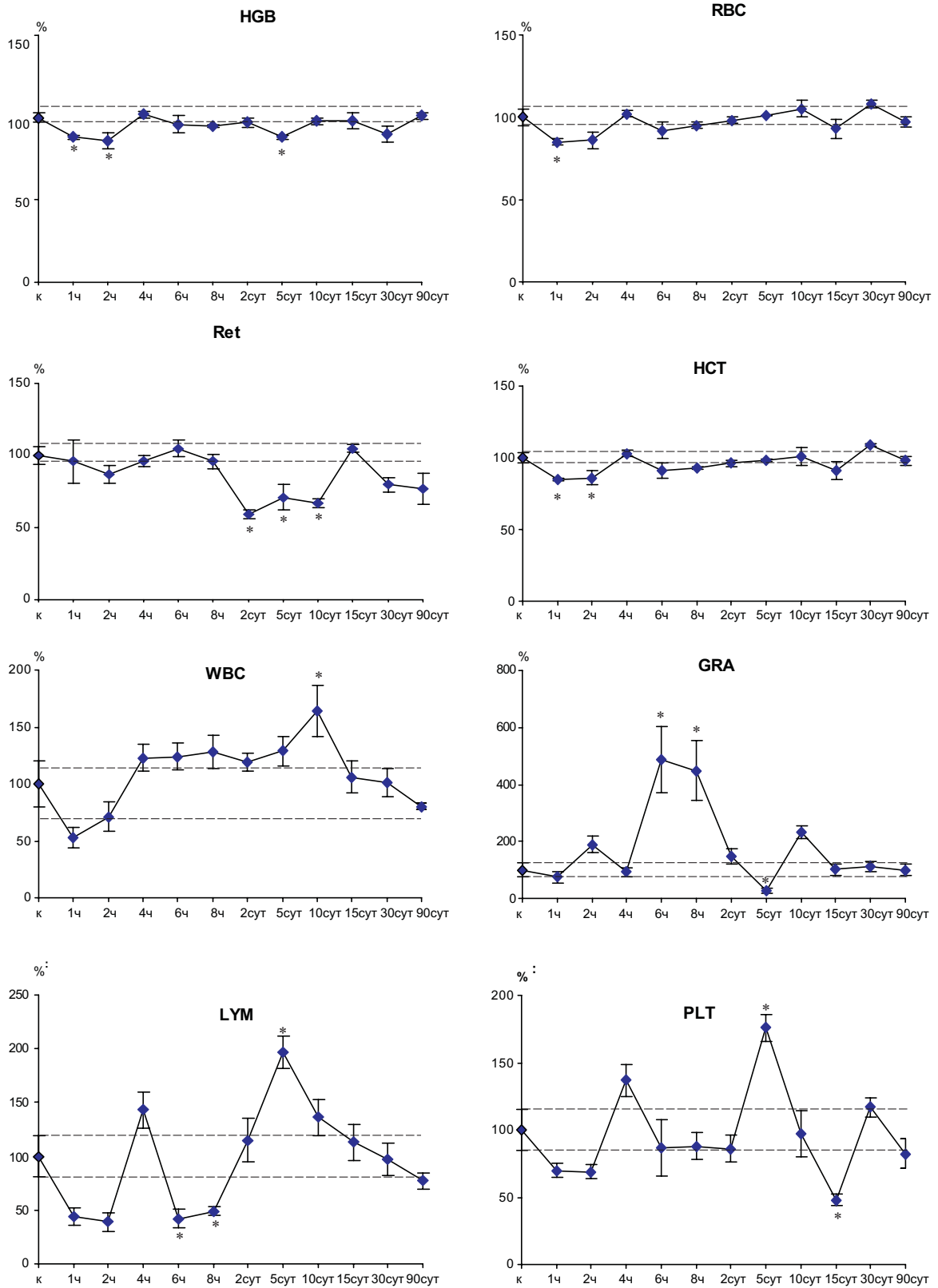


Рис. 1. Содержание гемоглобина (HGB), эритроцитов (RBC), ретикулоцитов (Ret), гематокрит (HCT); общее число лейкоцитов (WBC), нейтрофильных гранулоцитов (GRA), лимфоцитов (LYM) и тромбоцитов (PLT) в периферической крови крыс после введения митотакса в МПД (4,6 мг/кг).

Здесь и на рис. 2: по осям ординат — содержание клеток в процентах к контролю (100 %), по осям абсцисс — сроки опыта.

* — различия достоверны ($p < 0,05$) между опытом и контролем.

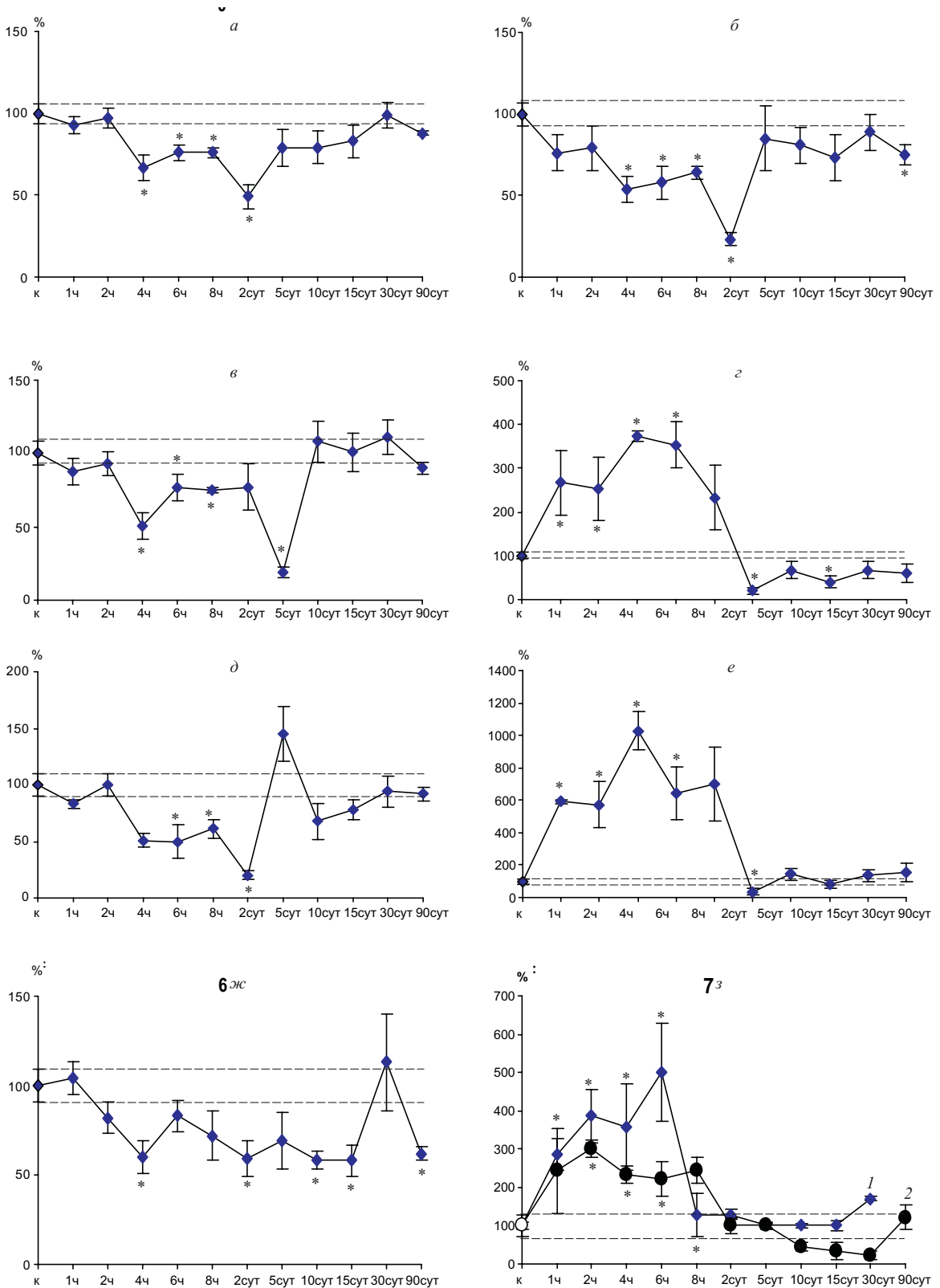


Рис. 2. Общее количество миелокарицитов (*а*), незрелых (*б*) и зрелых (*в*) нейтрофильных гранулоцитов, митозов гранулоцитарного ряда (*г*), эритроидных ядерных клеток (*д*), митозов эритронормобластов (*е*), лимфоцитов (*жс*) в костном мозге крысы; митозы клеток (*з*, 1) и число апоптотных клеток (*з*, 2) тимуса после введения митотакса в МПД (4,6 мг/кг).

Обозначения те же, что на рис. 1.

практически восстанавливалась, изменения телец Гас-сала сохранялись до конца опыта.

Через месяц после введения цитостатика большинство изученных показателей периферической крови, костного мозга и лимфоидных органов приходило к исходному уровню.

В поздние сроки исследования (90 сут) следует отметить снижение содержания лимфоцитов в периферической крови и костном мозге (рис. 1 и 2), среднее значение массы тимуса было ниже такового у животных контрольной группы аналогичного возраста (таблица). На гистологических препаратах тимуса через 3 мес после введения цитостатика у крыс дольки были уменьшены в размерах по сравнению с контролем, отмечалось развитие склероза.

ВЫВОДЫ

1. Митотакс при однократном внутривенном введении (4,6 мг/кг), обладая значительным митогенным, умеренным мутагенным и апоптозиндуцирующим действием, вызывает развитие обратимой гипоплазии костного мозга, лимфоидных органов, умеренной гипопластической анемии, тромбоцитопении, глубокой кратковременной нейтропении.

2. В отдаленные сроки после введения цитостатика (через 90 дней) наблюдается ускоренная возрастная инволюция тимуса, снижение содержания лимфоцитов в периферической крови и костном мозге крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. В. Артамонова, Л. В. Манзюк, *Русский медицинский журнал онкология*, **11**(26), 1464 – 1467 (2003).
2. М. Л. Гершанович, В. А. Филов, М. А. Акимов, А. А. Акимов, *Введение в фармакотерапию злокачественных опухолей*, СОТИС, Санкт-Петербург (1999).
3. Е. Д. Гольдберг, Г. В. Карпова, Е. А. Тимина, И. А. Хлусов, *Бюл. экпер. биол.*, **127**(1), 39 – 42 (1999).
4. *Исследование системы крови в клинической практике*, Г. И. Козинец и В. А. Макаров (ред.), Триада — X, Москва (1997).

Масса (в г) лимфоидных органов после введения митотакса в МПД, $X \pm m$

Срок опыта	Тимус	Селезенка
Контроль	0,4 ± 0,02	0,62 ± 0,03
1 ч	0,57 ± 0,11	0,77 ± 0,03*
2 ч	0,39 ± 0,04	0,72 ± 0,05
4 ч	0,42 ± 0,04	0,54 ± 0,03
6 ч	0,36 ± 0,03	0,66 ± 0,03
8 ч	0,34 ± 0,07	0,66 ± 0,07
24 ч	0,32 ± 0,02*	0,54 ± 0,04
5 сут	0,27 ± 0,04*	0,49 ± 0,06*
10 сут	0,38 ± 0,03	0,78 ± 0,05*
15 сут	0,35 ± 0,02	0,52 ± 0,03*
30 сут	0,36 ± 0,03	0,52 ± 0,03*
Контроль, 90 сут	0,35 ± 0,03	0,53 ± 0,05
90 сут	0,26 ± 0,02*	0,56 ± 0,07

Примечание. * — различия достоверны ($p < 0,05$) по отношению к соответствующему контролю.

5. Л. В. Манзюк, *Таксол в клинической практике*, Н. И. Переводчикова (ред.), Полина, Москва (2001), сс. 25 – 54.
6. Г. А. Меркулов, *Курс патогистологической техники*, Медицина, Ленинградское отд. (1969).
7. В. Н. Орлов, Г. А. Чудиновская, Е. П. Крюкова, *Исследование хромосомных наборов млекопитающих*, Наука, Москва (1976).
8. Я. В. Шпарык, *Вопр. онкол.*, **41**(1), 7 – 11 (1995).
9. E. Conte, V. Salvadori, S. Donati, et al., *Oncology*, **15**, 41 – 43 (2001).
10. J. J. Manfredi, J. Parness, and S. B. Horwitz, *J. Cell. Biol.*, **94**, 688 – 696 (1982).
11. C. G. Milross, K. A. Mason, N. R. Hunter, et al., *J. Nat. Cancer Inst.*, **88**, 1308 – 1314 (1996).
12. M. E. Trudeau, E. A. Eisenhauer, Higgins, et al., *J. Clin. Oncol.*, **14**, 422 – 428 (1996).

Поступила 19.09.06

MYELOTOKICITY OF PACLITAXEL (MITOTAX)

G. V. Karpova, T. I. Fomina, O. L. Voronova, E. V. Abramova, E. A. Timina, T. Yu. Lamzina, L. A. Ermolaeva, and A. V. Perova

Institute of Pharmacology, Tomsk Scientific Center, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, pr. Lenina 3, Tomsk, 634034, Russia

Paclitaxel (single intravenous injection in a maximum tolerated dose of 4.6 mg/kg) to white outbred rats causes bone marrow hypoplasia, increased granulocyte and erythroid cell mitosis (metaphase-anaphase transition), and moderate pancytopenia developments in peripheral blood (hypoplastic anemia, deep, short-term neutropenia, lymphopenia and thrombocytopenia) in the first hours after injection. A considerable increase of polyploidy (4n) cells and a moderate increase in the structural changes (chromatid deletions) of chromosomes was observed on bone marrow metaphase plates in 24 h. The drug introduction causes earlier increase in the rate of thymus cells mitosis, a growth in the number of thymocytes with apoptosis signs, and a moderate decrease in the thymus and spleen weight. All changes are reversible. Long-term (90 days after injection) observation revealed decreased lymphocyte count in the peripheral blood and bone marrow and earlier thymus involution.