

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ТЕСТ-АГЕНТА ВС1 (ДОНОВИТ-ВС)

РЕФЕРАТ

Опыт применения традиционных методов лечения таких, как хирургическое лечение, лучевая терапия или цитотоксическая химиотерапия, показал ограниченность их возможностей и крайне низкую эффективность при лечении местно-распространенных и диссеминированных форм злокачественных новообразований. При этом низкая эффективность цитотоксической терапии (как лучевой, так и химиотерапии) обусловлена низкой избирательностью противоопухолевого действия и высокой токсичностью в отношении нормальных и, как правило, жизненно важных органов и тканей. Возникающие на фоне цитотоксической терапии побочные реакции значительно лимитируют эффективность проводимого лечения, ухудшает качество жизни онкологических больных, а порой и представляют прямую угрозу их жизни.

Бурное развитие фундаментальных наук о живой природе, расширившее не только наше понимание механизмов возникновения и развития злокачественных опухолей, но и арсенал современных методов научных и клинических исследований, сделало возможным разработку принципиально новых стратегий лечения онкологических больных. К таким новым стратегиям относится противоопухолевая антиангиогенная терапия (ПАТ). В ее основе лежит зависимость роста и прогрессии злокачественных опухолей от степени их васкуляризации [1].

ПАТ принципиально отличается от цитотоксической терапии как по клеточным мишеням, так и по тем целям, которые перед ней стоят. Центральной клеточной мишенью ПАТ является не опухолевая клетка, а эндотелиальная клетка, как основная структурная единица васкулярной сети [2]. А основная цель ПАТ – не убить эндотелиальную клетку, а ингибировать ее пролиферацию и/или миграцию и/или дифференциацию. Цели ПАТ и ее мишени, определяют с одной стороны, необходимость длительного ее проведения (метрономное введение), с другой стороны, возможность использовать низкие дозы антиангиогенных препаратов (за счет как высокой биодоступности ингибиторов ангиогенеза, так и высокой чувствительности эндотелиальных клеток к их действию). Последнее обуславливает низкую токсичность (цитотоксичность) ПАТ в отношении нормальных органов и тканей.

В последнее десятилетие идет активный поиск биологически активных агентов, которые могут обеспечить эффективное ингибирование опухолевого ангиогенеза. Известно, что аконитин относится к группе алкалоидов с выраженной активностью в отношении клеточной мембраны. Он является классическим ингибитором натриевых каналов, играющими важную роль в выживании клеток и их функциональной активности. В особенности это касается таких нормальных клеток, как эндотелиальные, электрокинетические характеристики которых являются определяющими в процессе морфогенеза сосудов. В этой связи можно ожидать, что аконитин-содержащие биологически активные вещества могут проявлять способность к ингибированию опухолевого ангиогенеза. К таким потенциальным противоопухолевым агентам с антиангиогенным механизмом действия относится и тест-агент ВС1, краткое описание результатов доклинических исследований противоопухолевой активности и безопасности которого представлены ниже.

1. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ТЕСТ-АГЕНТА ВС1

Цель исследования – изучение специфической противоопухолевой активности тест-агента ВС1 в отношении перевивных экспериментальных опухолевых штаммов различного генеза и биологических свойств.

Задачи исследования:

1. Определить МПД для мышей и крыс в опытах по изучению острой токсичности тест-агента ВС1.
2. Доказать адекватность использования содержания аконитина для дозирования тест-агента ВС1.
3. Изучить противоопухолевое действие ВС1 в отношении лейкозных (асцитных) штаммов экспериментальных опухолей (L1210, асцитный вариант карциномы Эрлиха).
4. Изучить противоопухолевое действие ВС1 в отношении солидных экспериментальных опухолевых моделей (карцинома легкого Льюис, саркома 180, меланома В16, солидный вариант карциномы Эрлиха, карцинома Герена, глиома).
5. Исследовать зависимость противоопухолевого действия ВС1 от дозы.
6. Изучить механизм противоопухолевого действия тест-агента ВС1.
7. Изучить антиметастатическое действие тест-агента ВС1 (LLC, LLC/R9, меланома В16).
8. Провести сравнительное исследование противоопухолевой активности ВС1 и референтных противоопухолевых препаратов с антиангиогенным механизмом действия (циклофосфан и поликлональные антитела к фактору роста эндотелиальных клеток - anti-VEGF).
9. Исследовать противоопухолевую активность тест-агента ВС1 в отношении резистентных к cis-DDP опухолей (LLC/R9, резистентный вариант карциномы Герена).
10. Изучить эффективность противоопухолевого действия ВС1 в комбинации с cis-DDP.

Объект исследования

Фармакологическое средство тест-агент ВС1, в виде таблеток «Доновит-ВС» состава:

Наименование компонентов	Состав в граммах	
	1	2
1. Экстракт корня борца, содержащий сумму алкалоидов аконита в том числе аконитина	0,00001	0,00000025
2. Сахар молочный	0,29699	0,2969975
3. Кальция стеарат	0,003	0,003
Масса таблетки	0,3	0,3

Для проведения доклинических исследований, как специфической противоопухолевой активности, так и токсичности, таблетки измельчали в порошок и растворяли в дистиллированной воде.

Способ введения ВС1

Предполагаемый антиангиогенный механизм противоопухолевого действия тест-агента ВС1 обусловил выбор схемы его введения, характерной для противоопухолевых антиангиогенных препаратов (длительное метрономное введение). В этой связи во всех исследованиях 0,4 мл (для мышей) или 4 мл (для крыс) водного раствора тест-агента ВС1 вводили животным перорально с помощью зонда ежедневно 5 раз в неделю, начиная со второго дня после перевивки опухоли. Длительность терапии агентом зависела от биологических свойств опухолевых моделей и составляла 2 или 3 недели.

Экспериментальные животные и опухолевые модели

Исследования проводились на животных разведки вивария Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины с использованием перевивных штаммов экспериментальных опухолей из Национального Банка клеточных линий (Таблица 1).

Таблица 1. Экспериментальные опухолевые штаммы и линии животных, использованные в доклинических исследованиях специфической противоопухолевой активности ВС1

Опухолевые штаммы		Способ перевивки	Вид животных	Линии животных
Название	Обозначение			
Лимфоидная лейкемия	L1210	в/бр	Мыши	DBF ₁
Карцинома Эрлиха		п/к	Мыши	Белые нелинейные
		в/бр	Мыши	Белые нелинейные
Карцинома легкого Льюис (исходный вариант)	LLC	в/м	Мыши	C57/Bl
		в/в		
Карцинома легкого Льюис (вариант резистентный к cis-DDP с ангиогенез-зависимым ростом)	LLC/R9	в/м	Мыши	C57/Bl
		в/в		
Саркома мягких тканей	S180	в/м	Мыши	Белые нелинейные
Меланома	B16	в/м	Мыши	C57/Bl
Карцинома Герена (исходный вариант)		п/к	Крысы	Wistar
Карцинома Герена (вариант резистентный к cis-DDP)		п/к	Крысы	Wistar
Глиома		в/церебрально	Крысы	Wistar

Определение МТД

Исследования выживаемости мышей в остром опыте как функции дозы ВС1 (рассчитанной по содержанию аконитина) не выявили влияния пола животных, а также линии мышей на характер такой зависимости. МТД для мышей составило в среднем $1,8 \pm 0,1$ мкг аконитина на грамм веса мыши. МТД для крыс, вычисленная по данным МТД для мышей с помощью формулы

$$МПД_{крыса} = \frac{МПД_{мышь} * K_{мышь}}{K_{крыса}} \text{ (мг / кг)}$$

где $K_{мышь}$, $K_{крыса}$ - коэффициенты пересчета для мышей и крыс соответственно, равные 3,0 (для мышей весом 20 г) и 6,5 (для крыс весом 200 г) [3,4], составила $0,85 \pm 0,06$ мг/кг, что статистически не отличается от значения МТД, полученного экспериментально в опытах по острой токсичности ВС1 для крыс ($0,97 \pm 0,07$ мг/кг). Этот факт указывает на корректность использования формул пересчета доз ВС1 с одного вида биологического объекта на другой, что представляется очень важным для определения терапевтических доз для клинических исследований.

Дозирование ВС1

В рамках доклинических исследований дозирование многокомпонентного тест-агента ВС1 проводилось по содержанию в нем аконитина. Для доказательства адекватности использования аконитина в качестве основного фармакологически активного ингредиента тест-агента ВС1 были проведены сравнительные исследования влияния химически чистого аконитина (Sigma, США) и ВС1 (в эквивалентах по аконитину)

- на выживаемость мышей линии C57/Bl в опытах по острой токсичности

- на рост карциномы легкого Льюис (LLC)

Проведенные исследования показали, что зависимость гибели животных от дозы тест-агента ВС1 (рассчитанной по содержанию аконитина) существенно не отличается от таковой для чистого аконитина. При этом отсутствуют статистически достоверные отличия в МПД, которые для ВС1 составили $1,8 \pm 0,1$ мкг аконитина на грамм веса мыши, а для химически чистого аконитина – $1,7 \pm 0,3$ мкг/г веса животного.

Противоопухолевое действие тест-агента ВС1

Проведенные исследования показали, что тест-агент ВС1 проявляет выраженную противоопухолевую активность в отношении солидных опухолей с ангиогенез-зависимым ростом: солидный вариант карциномы Эрлиха, вариант карциномы Льюис LLC/R9 (с характерной для него зависимостью роста от степени васкуляризации), саркома 180, карцинома Герена, глиома) (Таблица 2). При этом противоопухолевый эффект, составляющий для большинства моделей более 70%, удерживался, по крайней мере, в течение недели после окончания терапии, или нарастал (как это имело место в случае саркомы 180). Важно отметить, что противоопухолевый эффект ВС1 носит дозозависимый характер. Максимальные его значения наблюдаются при сравнительно высоких суммарных дозах ВС1 равных МПД/2, а также при крайне низких (более чем в 20 раз ниже, чем МПД), что указывает на существование двух различных механизмов противоопухолевого действия ВС1. В низких суммарных дозах ВС1 проявляет скорее антиангиогенный противоопухолевый эффект, так как в этих дозах он эффективен в отношении опухолей с выраженной зависимостью роста от процессов неоваскуляризации. В суммарных дозах порядка МПД (МПД/2) ВС1 скорее оказывает антиваскулярное действие (цитотоксическое в отношении эндотелиальных клеток), а не прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки. На это указывают результаты сравнительного исследования противоопухолевого действия ВС1 в дозе МПД/2 в отношении асцитной и солидной опухолей карциномы Эрлиха, а также отсутствие противоопухолевого действия ВС1 в отношении лимфоидной лейкемии L1210.

Механизм противоопухолевого действия тест-агента ВС1.

Предположения, высказанные на основании сравнительного анализа противоопухолевого действия ВС1 в отношении перевивных опухолевых штаммов (в том числе, одного генеза, но разного типа роста), о способности ВС1 ингибировать рост сосудов полностью подтвердился и при изучении характера влияния этого агента на эндотелиальные и опухолевые клетки. Так было показано, что чувствительность эндотелиальных клеток линии МАЕС к цитотоксическому/цитостатическому действию ВС1 статистически достоверно выше, чем опухолевых клеток (Таблица 3). Более того эффективность цитотоксического/цитостатического действия ВС1 на активно пролиферирующие эндотелиальные клетки на порядок выше, чем на не пролиферирующие эндотелиоциты, что указывает на избирательность антиангиогенного действия ВС1 (способность стимулировать гибель активно пролиферирующих эндотелиальных клеток или ингибировать их пролиферацию) по сравнению с его цитотоксическим действием как на зрелые эндотелиоциты (антиваскулярное действие), так и на опухолевые клетки (прямое противоопухолевое действие).

Таблица 2. Противоопухолевое и антиметастатическое действие ВС1 в отношении перевиваемых опухолей

Опухолевые штаммы		Способ перевивки	Суммарная доза	Противоопухолевый эффект (% торможения)	Антиметастатический эффект (% торможения)		Увеличение продолжительности жизни (%)
Название	Обозначение				Кол-во метастазов	Объем метастазов	
Лимфоидная лейкемия	L1210	в/бр	МПД/2	-	-	-	0,0
Карцинома Эрлиха		п/к	МПД/2	77,0	-	-	-
		в/бр	МПД/2	-	-	-	0,0
Карцинома легкого Льюис (исходный вариант)	LLC	в/м	МПД/2	36,0	67,8	37,2	73,0
			МПД/30	0,0	0,0	0,0	-
			МПД/60	0,0	0,0	0,0	-
		в/в	МПД/200	-	0,0	0,0	-
Карцинома легкого Льюис (резистентный к cis-DDP вариант с ангиогенез-зависимым ростом)	LLC/R9	в/м	МПД/2	77,3	0,0	0,0	-
			МПД/20	0,0	0,0	0,0	-
			МПД/60	76,6	35,5	0,0	-
			МПД/100	68,0	46,0	69,3	-
			МПД/200	70,7	88,0	93,0	-
		в/в	МПД/200	-	92,2	78,6	-
Саркома мягких тканей	S180	в/м	МПД/2	60,0	-	-	-
Меланома	B16	в/м	МПД/60	0,0	0,0	52,0	-
			МПД/200	0,0	0,0	0,0	-
Карцинома Герена (исходный штамм)		п/к	МПД/20	77,0	-	-	-
			МПД/100	69,5	-	-	-
Карцинома Герена (резистентный к cis-DDP)		п/к	МПД/20	0,0	-	-	-
			МПД/100	0,0	-	-	-
Глиома		в/церебрально	МПД	-	-	-	19,2

Таблица 3. Значение IC₅₀ для ВС1 (концентрация агента, обеспечивающая 50% ингибирование роста клеток) в отношении опухолевых (LLC, LLC/R9) и эндотелиальных клеток (МАЕС)

Линия клеток	IC ₅₀ (мкг/мл)
LLC	23,5± 2,1
LLC/R9	13,3 ± 0,9
МАЕС (активно пролиферирующ.)	0.95 ± 0.06
МАЕС (не пролиферирующие)	8.7 ± 2.1

Исследования показали также, что в крайне низких не цитотоксических концентрациях тест-агента ВС1 проявляет проапоптотическое действие в отношении активно пролиферирующих эндотелиальных клеток и приводит к инверсии поверхностного заряда этих клеток (Таблица 4), не влияя при этом на опухолевые клетки. Известно, что в процессе формирования новых сосудов (морфогенез сосудов) положительно заряженная эндотелиальная клетка формирует плотный контакт с отрицательно заряженным миоцитом, образуя возбудимую клеточную пару. Изменение знака поверхностного заряда эндотелиоцита по действием тест-агента ВС1 препятствует морфогенезу сосуда, что приводит к ингибированию процессов неоваскуляризации. В этом случае ВС1 ведет себя как прямой ингибитор опухолевого ангиогенеза.

Таблица 4. Влияние ВС1 на характеристики клеток МАЕС

Концентрация ВС1 (мкг/мл)	Плотность поверхностного заряда (Кл/м ²)	Количество апоптотических клеток (%)
0,0	+6,85 ± 0,80	6,1± 0,13
0,04 (IC ₅₀ /20)	-8,49 ± 0,82	7,73 ± 0,18
0,08 (IC ₅₀ /10)	+3,41 ± 0,33	5,65 ± 0,64

Таким образом ВС1 может ингибировать рост опухоли, реализуя в зависимости от дозы (или концентрации) два разных механизма (предположение о существовании двух механизмов было сделано на основании сравнительного анализа результатов исследования противоопухолевого эффекта ВС1 как функции его дозы). При сравнительно высоких, но не цитотоксических по отношению к опухолевым клеткам концентрациях (или дозах), ВС1 реализует антивазкулярный механизм противоопухолевого действия. При низких концентрациях (субтоксических или нетоксических по отношению к активно-пролиферирующим эндотелиальным клеткам) ВС1 способен проявлять прямое антиангиогенное противоопухолевое действие.

Антиметастатическое действие тест-агента ВС1

Известно, что основной стратегической целью антиангиогенной противоопухолевой терапии является ингибирование процесса метастазирования. Поэтому проводилось исследование антиметастатического действия ВС1. Проведенные исследования подтвердили способность тест-агента ВС1 угнетать метастазирование как спонтанное, так и экспериментальное (Таблица 2). В большей степени это проявляется в способности ВС1 ингибировать рост метастазов, что проявляется в уменьшении объема метастатического поражения. Такое свойство ВС1 проявляется даже в отношении меланомы В16 несмотря на то, что ВС1 не влияет на рост первичной опухоли меланомы и на количество метастазов в легких. Значительный антиметастатический эффект обуславливает увеличение продолжительности жизни мышей с карциномой Льюис на 73% на фоне слабого противоопухолевого эффекта. Наши исследования показали, что уменьшение объема

метастатического поражения в этом случае обусловлено уменьшением доли метастазов, находящихся в васкулярной фазе роста (метастазы диаметром более 1 мм).

Сравнительное исследование противоопухолевой активности BC1 и референтных противоопухолевых препаратов с антиангиогенным механизмом действия (циклофосфан и поликлональные антитела к фактору роста эндотелиальных клеток - anti-VEGF).

В качестве одного из референтных препаратов был выбран Циклофосфан в режиме антиангиогенной терапии (метрономное пероральное введение в суммарной дозе 200 мг/кг. Способность циклофосфана в нецитотоксических дозах при метрономном режиме введения ингибировать опухолевый ангиогенез была продемонстрирована как в доклинических, так и клинических исследованиях [5,6]. Нашими исследованиями было показано, что в основе антиангиогенного действия циклофосфана в этом режиме лежит его способность значительно ингибировать продукцию проангиогенных факторов опухолевыми клетками (не прямое антиангиогенное действие).

Таблица 5. Противоопухолевый эффект тест-агента BC1, циклофосфана (CP) и мышинных антител к VEGF в отношении исходного (LLC) и cis-DDP-резистентного варианта (LLC/R9) карциномы легкого Льюис

Противоопухолевый эффект (%)	LLC			LLC/R9		
	BC1 0,9 мг/кг	CP 200,0 мг/кг	Anti-VEGF 20 нг/мышь	BC1 0,9 мг/кг	CP 200,0 мг/кг	Anti-VEGF 20 нг/мышь
Торможение роста первичной опухоли	36,0	0,0	0,0	77,3	47,0	18,0

Сравнительное исследование противоопухолевого действия циклофосфана и BC1 при их метрономном пероральном введении в суммарной дозе МПД/2 в отношении LLC и LLC/R9 показало, что тест-агент BC1 оказывает более выраженное ингибирующее действие на рост первичной опухоли, чем циклофосфан (Таблица 5).

Аналогичный результат был получен при сравнительном исследовании влияния поликлональных мышинных антител к VEGF (мышинный аналог Бевацизумаба) и тест-агента BC1. Следует правда отметить, что используемая в исследованиях доза антител была в 2-3 раза ниже терапевтической. С другой стороны (как видно из Таблицы 2) BC1 в дозе 100 раз меньшей, чем МПД/2 обуславливает очень высокий противоопухолевый эффект в отношении LLC/R9.

Таким образом, BC1 проявляет более выраженный противоопухолевый эффект в сравнении с известными противоопухолевыми препаратами.

Противоопухолевая активность тест-агента BC1 в отношении резистентных к cis-DDP опухолей (LLC/R9, резистентный вариант карциномы Герена)

Проведенные исследования не выявили эффективности BC1 в отношении cis-DDP резистентной карциномы Герена у крыс (Таблица 2). Эффективность этого тест-агента по отношению к cis-DDP резистентному варианту карциномы легкого Льюис, скорее всего, связана не с лекарственной резистентностью данных клеток, а с высокой зависимостью скорости роста данной опухоли от процессов опухолевого ангиогенеза.

Эффективность противоопухолевого действия BC1 в комбинации с cis-DDP.

Известно, что антиангиогенная терапия не может быть радикальной. Поэтому в клинической практике антиангиогенная терапия проводится в комбинации с традиционной противоопухолевой.

С целью изучения эффективности ВС1 в комбинированной терапии были проведены исследования противоопухолевого и антиметастатического действия комбинации ВС1 (15 пероральных метрономных введений в суммарной дозе $1,8 \cdot 10^{-2}$ мг/кг) и cis-DDP (6 в/бр введений в суммарной терапевтической дозе 7,2 мг/кг). Как видно из Таблицы 6, эффективность комбинированной терапии двумя агентами существенно больше, чем каждого в отдельности, что обусловлено аддитивным противоопухолевым и антиметастатическим их действием.

Таблица 6. Противоопухолевое действие тест-агента ВС1 и противоопухолевого препарата cis-DDP в отношении cis-DDP-резистентного варианта карциномы легкого Льюис (LLC/R9) в монотерапии и при совместном использовании

Противоопухолевый эффект (%)	BC1	Cis-DDP	BC1+ Cis-DDP
Торможение роста первичной опухоли	68,0	0,0	60,0
Уменьшение количества метастазов	46,0	48,7	69,7
Уменьшение объема метастазов	69,3	66,5	91,3

ВЫВОДЫ

Таким образом доклинические исследования специфической фармакологической активности тест-агента ВС1 выявили его способность ингибировать рост трех видов солидных опухолей на двух видах животных более чем на 70% и значительно ингибировать процесс метастазирования, уменьшая как количество метастазов более чем на 80%, так и объем метастатического поражения вплоть до 90%. Метрономное введение ВС1 обуславливает увеличение продолжительности жизни животных с солидной опухолью на 73%. Противоопухолевый и антиметастатический эффект носит дозозависимый характер и обусловлен реализацией двух механизмов действия: антивазкулярного (при суммарных дозах порядка МПД/2) и антиангиогенного (при суммарных дозах меньших, чем МПД/20). Антиангиогенный механизм действия ВС1 обуславливает противоопухолевое и антиметастатическое его действия только в отношении злокачественных новообразований с ангиогенез-зависимым ростом. При этом ВС1 проявляет более значительный противоопухолевый и антиметастатический эффект по сравнению с традиционными противоопухолевыми препаратами с антиангиогенным механизмом действия (такими как циклофосфан и авастин). Эффективен ВС1 и при комбинированном применении с cis-DDP.

Литература

1. Scappaticci F. Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3906-27.
2. Dutour A, Rigaud M. Tumor endothelial cells are targets for selective therapies: in vitro and in vivo models to evaluate antiangiogenic strategies. *Anticancer Res.* 2005;25(6B):3799-807.
3. Уланова И.П., Сидоров К.К., Халепо А.И. К вопросу об учете поверхности тела экспериментальных животных при токсикологическом исследовании. Под редакцией А.А.Летавета и И.В.Саноцкого, Л. Изд. «Медицина», 1968, вып. 10, стр 18-25.
4. 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.-Vol.50.-N4.-P.219-244.
5. Shaked Y, Emmenegger U, Francia G, Chen L, Lee CR, Man S, Paraghamian A, Ben-David Y, Kerbel RS. Low-dose Metronomic Combined with Intermittent Bolus-dose Cyclophosphamide Is an Effective Long-term Chemotherapy Treatment Strategy. *Cancer Res* 2005; 65: 7045-51.
6. Blansfield JA, Caragacianu D, Alexander HR 3rd, Tangrea MA, Morita SY, Lorang D, Schafer P, Muller G, Stirling D, Royal RE, Libutti SK. Combining agents that target the tumor microenvironment improves the efficacy of anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 270-80.

2. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ТЕСТ-АГЕНТА ВС1 (ДОНОВИТ-ВС)

Исследование острой токсичности ВС1 на мышах (самцах и самках) и крысах

Цель исследований – количественное определение связи между однократной дозой тест-агента и выживаемостью животных и исследование токсичности ВС1 в отношении нормальных органов и тканей.

Задачи исследования

1. Количественное определение однократно летальных доз тест-агента ВС1 - LD₅₀ и LD₁₀(МПД) на мышах и крысах.
2. Изучение токсического действия ВС1 на нормальные органы и ткани после однократного введения тест агента.

Структура исследований

Для исследования токсических свойств ВС1 на мышах в остром опыте использовали девять групп животных (для самок) и семь – для самцов. При изучении острой токсичности у крыс было сформировано 6 групп животных. Животным контрольных групп вводили перорально воду, а животным опытных – водный раствор ВС1 в прогрессивно уменьшающихся дозах. Длительность наблюдения – 14 дней.

На протяжении 14 дней проводили токсикометрические наблюдения. Морфологические исследования (ткани печени, почек, селезенки, легкого, желудка, тонкого кишечника, сердца) проводили у всех погибших животных. Через 14 дней у оставшихся животных проводили биохимические, морфологические исследования, цитологические исследования костного мозга и периферической крови.

Результаты исследований

В результате исследований установлено, что токсические проявления ВС1 (независимо от вида животных и пола) носили выраженный дозозависимый характер. Следует подчеркнуть, что гибель животных наблюдалась только на протяжении 5-60 минут после введения препарата. Спустя 1 час после введения ВС1 и на протяжении всего периода наблюдения (14 суток) падежа крыс и мышей не было отмечено, что указывает на низкую кумулятивную токсичность этого агента.

Анализ динамики гибели животных позволил определить дозовые (по содержанию аконитина) характеристики летальной токсичности агента ВС1 Таблица 2.1.

Таблица 2.1. Дозовые показатели летальной токсичности ВС1

Вид животных	LD ₉₀ (мкг/г)	LD ₅₀ (мкг/г)	МПД (мкг/г)
Мыши линии С57В1/6 (самки)	5,9 ± 0,9	2,9 ± 0,53	1,8 ± 0,4
Мыши линии С57В1/6 (самцы)	4,2 ± 1,4	2,2 ± 0,6	1,4 ± 0,35
Крысы линии Wistar (самки)	3,45±0,34	1,56±0,11	0,95±0,07

Следует отметить, что предсказание МПД для крыс, сделанные на основании МПД для мышей (в рамках одного пола) с применением формулы видового пересчета практически полностью совпадали с данными, полученными в остром опыте, что дает основания использовать эти формулы при определении диапазона токсических и терапевтических доз для клинических исследований.

Проведенные исследования показали, что ВС1 проявляет токсичность в летальных и сублетальных дозах преимущественно в первые минуты после однократного введения. При этом имеет место нарушение двигательной и дыхательной активности животных. Морфологически наблюдаются кровоизлияния во все исследуемые органы, что указывает на существенные

изменения проницаемости васкулярной сети, индуцированные ВС1. Характер изменений в системе гемопоза в этом случае коррелирован с наблюдаемой картиной кровоизлияний. Наиболее существенные изменения выражаются в тромбоцитозе (не зависимо от вида животных). Характер и величина токсического влияния ВС1 на белый и красный кровяные ростки зависят от вида животных и отличаются у крыс и мышей. При этом существенного токсического влияния ВС1 на костный мозг животных обоих видов не фиксируется. Через две недели клинические проявления токсичности ВС1 у выживших животных в высоких дозах не обнаружены. В тканях, на фоне регенеративных процессов, сохраняются еще дистрофические изменения.

В нетоксических дозах влияние ВС1 на нормальные органы и ткани или отсутствовало, или было минимальным.

Иммунотоксичность

Целью исследования было изучение токсического влияния тест агента ВС1 на иммунную систему мышей.

В задачи исследования входила оценка токсического влияния ВС1 на

- В - клеточный иммунитет (гуморальный ответ);
- Т- клеточный иммунитет (клеточные реакции);
- функциональную активность макрофагов (фактор неспецифической резистентности организма);
- функциональную активность естественных киллерных клеток селезенки мышей (фактор неспецифической резистентности организма);
- массу и клеточность лимфоидных органов, включая клеточность костного мозга (активность факторов, которые берут участие в специфическом иммунитете).

Структура исследований

Всех мышей распределяли на 3 группы: одну контрольную и две опытные (по 6 животных в каждой группе). Животным двух опытных групп на протяжении 5 суток перорально вводили растворенный в 0,5 мл воды препарат ВС1 в дозах: МПД/20 и МПД/2, соответственно. Животные контрольной группы получали воду по аналогичной схеме введения.

Результаты исследований

Показано, что тест-агент ВС1 в суммарных дозах МПД/4 и 2.5*МПД не оказывает иммунотоксического влияния на гуморальное и клеточное звенья иммунной системы мышей. Отсутствует также токсические проявления ВС1 в отношении центральных и периферических органов и клеток иммунной системы. Не выявлено иммунотоксическое действие ВС1 в отношении факторов неспецифического иммунитета. В высокой дозе (МПД/2) ВС1 проявляет слабо выраженную способность незначительно угнетать уровень функциональной активности перитонеальных макрофагов.

В низкой дозе, равной МПД/4, (соответствующей верхней границе терапевтической дозы) ВС1 способен оказывать стимулирующее действие на иммунную систему, усиливая Т клеточный иммунитет.

Кумулятивная и хроническая токсичность ВС1 на мышах линии С57/В1

Целью исследования было изучение кумулятивной и хронической токсичности тест агента ВС1 на мышах линии С57/В1.

В задачи исследования входили:

- Токсикометрические исследования (включая динамику изменения веса животных и массы внутренних органов)
- Биохимические исследования функциональной активности почек и печени.
- Морфологические исследования (ткани печени, почек, селезенки, легкого, тонкого кишечника и сердца подопытных животных).

- Исследования влияния ВС1 на систему гемопоза (костный мозг эпифиза бедренной кости и периферическая кровь животных).

Морфологические, биохимические, токсикометрические исследования и исследования влияния ВС1 на гемопоз проводили по окончании введения ВС1 у половины животных каждой группы и через 4 недели после окончания введения агента для анализа процессов реабилитации у оставшихся мышей. В указанные сроки животных умерщвляли под легким эфирным наркозом путем декапитации.

Структура исследований

Для исследования кумулятивных свойств агента ВС1 и хронической токсичности было сформировано 4 группы животных по 14 животных в каждой. С0 (контроль) – мыши, получавшие per os воду для инъекций; С1, С2, С3 - мыши, получавшие per os ВС1 в суточной дозе МПД/100, МПД/30, МПД/10 соответственно. ВС1 вводили мышам в объеме 0,4 мл с помощью зонда ежедневно 5 раз в неделю на протяжении 4 месяцев. Суммарные дозы ВС1, полученные животными за время исследований хронической токсичности составили 0,9*МПД, 3*МПД, 9*МПД. Следует подчеркнуть, что суммарная терапевтическая доза ВС1 не превышает МПД/2.

Результаты исследований

Проведенные исследования показали, что ВС1 характеризуется низким уровнем кумуляции – длительное (4 месячное) введение ВС1 в суммарной дозе 9*МПД, которая в 90 раз выше суммарной терапевтической дозы (не превышающей МПД/10) и более чем в 30 раз выше LD₅₀, не вызывает гибели животных.

В терапевтической дозе ВС1 не оказывает токсического действия на все исследуемые системы и ткани организма животных.

Наблюдаемые морфологические изменения структуры паренхиматозных органов при высоких суммарных дозах ВС1 не сопровождались функциональными изменениями в них, а сводились главным образом к признакам нарушения функциональной состоятельности кровеносных капилляров, базальных мембран и соединительно-тканых прослоек, ограничивающих структурные элементы органов, что проявлялось в образовании гидротированных пространств вокруг этих структур, диапедезе эритроцитов, в истончении стенок кровеносных капилляров. Такой характер побочных действий ВС1 напрямую связан с механизмом его противоопухолевого действия, направленного на ингибирование процессов ангиогенеза, и носит обратимый характер: через 4 недели наблюдается преимущественная нормализация морфологической структуры органов и тканей.

При высоких дозах ВС1 оказывает слабое токсическое действие на систему кроветворения. Так при высоких дозах отмечается тенденция к повышению количества лейкоцитов по мере увеличения дозы ВС1 и значительное (статистически достоверное) перераспределение популяций лейкоцитов в сторону уменьшения количества лимфоцитов и увеличения количества нейтрофилов. Возрастает также количество эритроцитов в периферической крови и эритроидных клеток в костном мозге, что обусловлено, скорее всего, компенсаторной реакцией системы кроветворения в ответ на индуцированный ВС1 диапедез эритроцитов. Наблюдаемые побочные действия ВС1 в отношении гемопоза носят полностью обратимый характер и исчезают за 4 недели восстановительного периода.

ВС1 ни в одной из исследуемых доз не оказывает токсического действия на функциональную активность почек, и не влияет на активность основных ферментов печени.

Исследование хронической токсичности агента ВС1 на свиньях породы вьетнамские вислобрюхие

Цель исследования изучение токсичности ВС1 при повторных его пероральных введениях в рамках хронического опыта на свиньях.

В задачи исследования входили:

- Клинические наблюдения.
- Гематологические исследования
- Биохимические исследования периферической крови.
- Кардиологические исследования (электрокардиография).
- Морфологические исследования (ткани печени, почек, селезенки, легкого, желудка, поджелудочной железы, тонкого кишечника, надпочечников и сердца подопытных животных).
- Исследования влияния ВС1 на систему гемопоза (костный мозг эпифиза бедренной кости и периферическая кровь животных).

Структура исследований

Исследования были выполнены на свиньях-самках, породы вьетнамские вислобрюхие в 2-х месячном возрасте, весом от 5,6 до 7,1кг. Были сформированы 2 группы животных: контрольная – 2 особи и подопытная - 3 особи. Подопытные животные получали вместе с пищей ВС1 ежедневно, 5 раз в неделю на протяжении 20 недель. Контрольные животные - только пищу.

Суммарная доза ВС1 для терапии ВС1 была близка к верхней границе терапевтической дозы и равнялась $P * МПД_{свин} / 12$ (P – вес животных в кг), что к окончанию терапии для каждого животного составило в среднем $4,2 \pm 0,2$ грамма ВС1 (или 0,53 мг по содержанию аконитина). $МПД_{свин}$ определяли по формуле пересчета. При расчете суточной дозы вводимого ВС1 исходили из суммарной дозы с учетом длительности введения и изменяющегося веса животных

Результаты исследований

Длительное пероральное введение ВС1 свиньям породы вьетнамские вислобрюхие не вызывало изменений в поведении животных и биохимических показателях, которые бы указывали на токсическое действие агента. Проведенные исследования указывают и на отсутствие кардиотоксичности ВС1. Не выявлено и гемотоксическое действие ВС1. Наблюдаемая тенденция к уменьшению более зрелых клеток эритроидного ростка с одновременным повышением количества мегакариоцитов у животных опытной группы скорее всего связано с механизмом действия ВС1, который (дозозависимым образом) может приводить к повышению проницаемости сосудов с последующим выходом в межклеточное пространство эритроцитов. Такое явление было ярко выражено в остром опыте при высоких дозах ВС1, и в незначительной степени проявлялось и в хроническом. Выход эритроцитов в межклеточное пространство было зафиксировано у некоторых животных опытной группы на гистологических препаратах печени.

Следует подчеркнуть, что гистологический анализ слизистой желудка и тонкого кишечника после длительного перорального приема ВС1 не выявил признаков раздражающего действия тест-агента.

Таким образом, тест-агент ВС1 не проявляет токсичности при хроническом введении его животным. Более того, обращает на себя внимание позитивное влияние ВС1 на мочевыводящую систему, которое проявляется в снижении уровня креатинина и мочевины у животных, получавших ВС1, (по сравнению с контрольными свиньями).