

ВИЗНАЧЕННЯ ДЕЯКИХ ПОКАЗНИКІВ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ МЕЛФАЛАНУ В ЩУРІВ

Вступ. Гематотоксичність та ураження слизових оболонок шлунково-кишкового тракту при лікуванні злоякісних новоутворень є основними лімітуючими факторами ефективного лікування і часто призводять до переривання та відстрочення хіміотерапії. Пошук нових ефективних лікарських засобів, біоматеріалів і речовин для пом'якшення та зменшення інтенсивності побічних реакцій протипухлинної хіміотерапії є надзвичайно актуальним. Для їх апробації та проведення доклінічних досліджень необхідна модель, яка б відтворювала типові побічні ефекти поліхіміотерапії. Відомо, що найбільш виражений токсичний вплив на кістковий мозок та шлунково-кишковий тракт (а саме слизові оболонки) мають алкілюючі протипухлинні засоби з властивостями радіоміметиків.

Мета дослідження – провести скринінгові дослідження із застосуванням цитостатика мелфалану з метою визначення основних параметрів токсичності та подальшого апробування як моделі цитостатичної мієлодепресії для виконання подальших доклінічних досліджень.

Методи дослідження. Дослідження виконано на статевозрілих щурах, яких було поділено на групи. Тваринам ввели одноразово у хвостову вену мелфалан у дозах 3, 6, 9 та 12 мг/кг. Основні показники гострої токсичності (летальна доза LD_{50} , $1/LD_{50}$ – абсолютна токсичність, LD_{84}/LD_{16} – зона гострої токсичної дії, $1/(LD_{50} - S)$ – сумарний показник токсичності та S – функція кута нахилу (варіабельність смертельних доз)) визначали методом найменших квадратів для пробіт-аналізу кривих летальності за В. Б. Прозоровським та за методом Фінні з використанням програми StatPlus 2009 Professional 5.8.4.

Результати й обговорення. Як свідчать дані регресійного аналізу за методом Фінні, LD_{50} становила $(4,22 \pm 0,62)$ мг/кг (нижня межа LD_{50} – 3,10 мг/кг, а верхня – 5,49 мг/кг). Показники за методом Прозоровського: LD_{50} мелфалану при одноразовому внутрішньовенному введенні – $(4,765 \pm 1,003)$ мг/кг (від 2,63 мг/кг (нижня межа) до 6,90 мг/кг (верхня межа)).

Висновок. Для проведення експериментів, апробування моделі цитостатичної мієлодепресії та подальшого вивчення впливу чинників корекції на стан кісткового мозку і показники периферичної крові було обрано дозу мелфалану 3 мг/кг одноразово внутрішньовенно.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мелфалан; гостра токсичність; щури; LD_{50} .

ВСТУП. Гематотоксичність та ураження слизових оболонок шлунково-кишкового тракту (ШКТ) при лікуванні злоякісних новоутворень є основними лімітуючими факторами ефективного лікування і часто призводять до переривання та відстрочення хіміотерапії [1, 2]. Антинеопластичні лікарські засоби не мають вибіркової дії, тому страждають і здорові швидкопроліферуючі тканини та клітини організму. У хворих досить часто розвивається цитотоксична діарея, рідше виникають закрепи. Можуть розвиватися так звані мукозити. Цей термін об'єднує запальні (еритематозні й ерозивно-виразкові) ураження слизових оболонок ротової порожнини, глотки,

© О. О. Шевчук, 2019.

стравоходу та ШКТ у цілому, які виникають у результаті проведення протипухлинної терапії [3, 4]. Розвиток мукозитів суттєво підвищує вартість лікування, збільшує тривалість госпіталізації хворих та може навіть призвести до смерті (через виникнення нутритивної недостатності або безпосередньо внаслідок розвитку септичних ускладнень у зв'язку з порушенням бар'єрної функції слизових оболонок ШКТ). Перербіг мукозитів значно тяжчий, а тривалість їх більша на тлі нейтропенії, що теж має негативний вплив на загальний стан хворого [5].

На сьогодні препарати гранулоцитарного колонієстимулювального фактора включено в основні протоколи терапії пацієнтів з онкопато-

логією для профілактики і лікування лейкопенії та фебрильної нейтропенії [6, 7]. Однак вони не мають впливу на розвиток уражень слизових оболонок ШКТ. З огляду на вищесказане, пошук нових ефективних лікарських засобів, біоматеріалів і речовин для пом'якшення та зменшення інтенсивності побічних реакцій протипухлинної хіміотерапії є надзвичайно актуальним. Для їх апробації та проведення доклінічних досліджень необхідна модель, яка б відтворювала типові побічні ефекти поліхіміотерапії. Відомо, що найбільш виражений токсичний вплив на кістковий мозок та шлунково-кишковий тракт (а саме слизові оболонки) мають алкілюючі протипухлинні засоби з властивостями радіоміметиків (їх дія подібна до ураження іонізуючим випромінюванням) [8]. Одним із них є мелфалан (L-PAM, L-сарколізин).

Мета дослідження – провести скринінгові дослідження із застосуванням цитостатика мелфалану з метою визначення основних параметрів токсичності та подальшого апробування як моделі цитостатичної мієлодепресії для виконання подальших доклінічних досліджень.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для визначення LD_{50} та вибору дози мелфалану з метою моделювання цитостатичної мієлодепресії було досліджено його гостру токсичність на нелінійних щурах-самцях масою 180–220 г, яких поділили на групи: групи тварин, які отримали одноразово мелфалан у дозах 3, 6, 9 мг/кг ($n=8$), та група щурів, яким одноразово внутрішньовенно ввели цитостатик у дозі 12 мг/кг ($n=7$). У досліді використано L-PAM виробництва “GlaxoSmithKline”, алкеран, ліофілізат 50 мг для приготування розчину для внутрішньосудинного введення.

Усі маніпуляції проведено з дотриманням принципів біоетики відповідно до положення Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes) (Страсбург, 1986), Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” (від 15.12.2009 р. № 1759-VI) і Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 EU щодо експериментів на тваринах.

Основним критерієм кількісної характеристики токсичності є летальна доза LD_{50} , яку було визначено методом найменших квадратів для пробіт-аналізу кривих летальності за В. В. Прозоровським та за методом Фінні [9, 10] з використанням програми StatPlus 2009 Professional 5.8.4 (AnalystSoft, США, 2009), яка дає можливість в автоматизованому режимі отримати графіки й основні токсикометричні показники.

Крім того, було розраховано такі показники небезпеки, як: $1/LD_{50}$ – обернена величина середньосмертельної дози (абсолютна токсичність), LD_{84}/LD_{16} – діапазон смертельних доз (зона гострої токсичної дії), $1/(LD_{50} - S)$ – сумарний показник токсичності та S – функція кута нахилу (варіабельність смертельних доз). Для цього використано формулу:

$$S = \left(\frac{LD_{84}}{LD_{50}} + \frac{LD_{50}}{LD_{16}} \right) \div 2.$$

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У структурі ускладнень, що виникають при проведенні поліхіміотерапії, за даними багатьох авторів, лідируючу позицію займає ураження мієлоїдного ростка кровотворення. Різні схеми із застосуванням 3–4–5 цитостатиків тією чи іншою мірою знижують вміст гранулоцитів у крові [11, 12]. Мелфалан – біфункціональна алкілююча сполука, фенілаланінове похідне азотистого іприту. Зазвичай його використовують для лікування множинної мієломи, поширеного раку яєчників, лейкомії та при підготовці пацієнтів до пересадження кісткового мозку. Мелфалан є потужним радіоміметиком з вираженими мієлодепресивними властивостями. Оскільки мішенню для даного лікарського засобу є клітини, що активно проліферують, їх загибель прямо корелює з його дозою [9, 10].

Пероральне застосування препарату характеризується значною варіабельністю всмоктування, яке залежить від різних факторів (неповне всмоктування у ШКТ, варіабельність метаболізму в печінці та можлива пресистемна елімінація препарату, споживання жирної їжі знижують біодоступність засобу на 36–54%), тому його було введено одноразово внутрішньовенно [13, 14].

У таблиці 1 та на рисунку наведено результати пробіт-аналізу за методом Фінні, розрахо-

Таблиця 1 – Пробіт-аналіз за методом Фінні (логнормальний закон розподілу)

Log10 (стимул (доза))	Відсоток (%)	Відсоток (пробіт, %)	Кількість тварин у групі	R	E (R)	Різниця	Хі-квадрат
0,4771	0,125	0,1205	8	1	0,9642	0,0368	0,0013
0,7782	0,875	0,8868	8	7	7,0944	-0,0944	0,0013
0,9542	0,9688	0,9954	8	7,75	7,9630	-0,2130	0,0057
1,0792	0,9643	0,9998	7	6,75	6,9988	-0,2488	0,0088

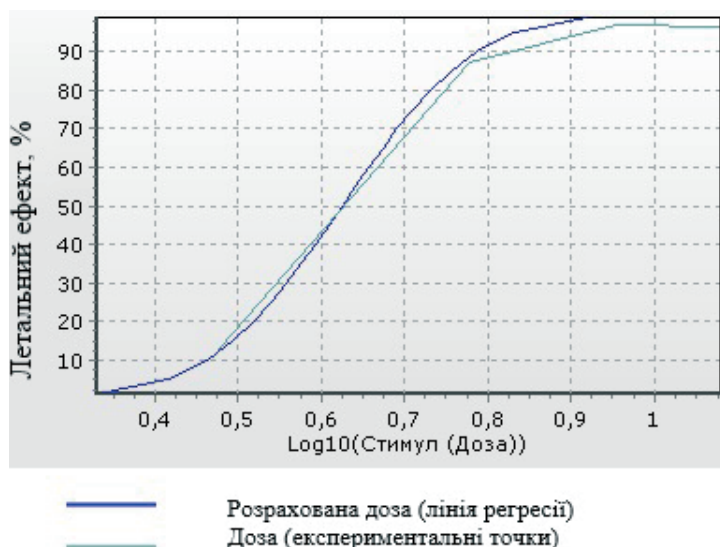


Рис. Залежність між випробуваними дозами мелфалану і летальним ефектом у щурів при внутрішньовенному шляху введення. Пробіт-аналіз за методом Фінні.

вані за допомогою програмного забезпечення StatPlus 2009 Professional 5.8.4.

Як свідчать дані регресійного аналізу за методом Фінні, LD_{50} становила $(4,22 \pm 0,62)$ мг/кг

(нижня межа LD_{50} – 3,10 мг/кг, а верхня – 5,49 мг/кг).

У таблицях 2 і 3 наведено дані та основні показники гострої токсичності мелфалану, розраховані за методом Прозоровського.

Таблиця 2 – Пробіт-аналіз за методом Прозоровського (нормальний закон розподілу)

Стимул (доза)	Відсоток (%)	Кількість тварин у групі	Пробіт, Y	Ваговий коефіцієнт, Z
3	0,125	8	3,8496	3,0487
6	0,875	8	6,1504	3,0487
9	0,9688	8	6,8631	1,2737
12	0,9643	7	6,8031	1,3937

Таблиця 3 – Основні показники гострої токсичності мелфалану при його одноразовому внутрішньовенному введенні, розраховані за методом Прозоровського

Показник	За методом Прозоровського
LD_{50}	4,765
Стандартна похибка LD_{50}	1,003
Нижня межа LD_{50}	2,627
Верхня межа LD_{50}	6,9029
LD_{10}	1,1287
LD_{16}	1,9279
LD_{84}	7,602
LD_{90}	8,4014
LD_{100}	9,0205
Абсолютна токсичність ($1/LD_{50}$)	0,21
Зона гострої токсичної дії (LD_{84}/LD_{16})	3,94
Функція кута нахилу (варіабельність смертельних доз, S)	2,033
Сумарний показник токсичності ($1/(LD_{50} - S)$)	0,366
Рівень значущості	0,05

ВИСНОВКИ. При використанні методу Прозоровського LD_{50} мелфалану, який ввели одноразово внутрішньовенно, становила $(4,765 \pm 1,003)$ мг/кг (від 2,63 мг/кг (нижня межа) до 6,90 мг/кг (верхня межа)). Для проведення ек-

периментів, апробування моделі цитостатичної мієлодепресії та подальшого вивчення впливу чинників корекції на стан кісткового мозку і показники периферичної крові було обрано дозу мелфалану 3 мг/кг одноразово внутрішньовенно.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. The influence of enterosorption on some haematological and biochemical indices of the normal rats after single injection of melphalan / O. O. Shevchuk, K. A. Posokhova, A. S. Sidorenko [et al.] // *Exp. Oncol.* – 2014. – No. 36. – P. 94–100.
2. Puyo S. From old alkylating agents to new minor groove binders / S. Puyo, D. Montaudon, P. Pourquier // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2014. – No. 89. – P. 43–61.
3. Parkhill A. L. Oral mucositis and stomatitis associated with conventional and targeted anticancer therapy / A. L. Parkhill // *J. Pharmacovigil.* – 2013. – 3, No. 1. DOI: 10.4172/2329-6887.1000112.
4. Oral mucositis induced by anticancer therapies / S. Al-Ansari, J. A. E. M. Zecha, A. Barasch [et al.] // *Curr. Oral Heal Reports.* – 2015. – No. 2. – P. 202–211.
5. The reduction of oxidative stress by nanocomposite Fullerol decreases mucositis severity and reverts leukopenia induced by Irinotecan / R. D. N. Arifa, T. P. de Paula, M. F. M. Madeira [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2016. – No. 107. – P. 102–110.
6. Dose delays, dose reductions, and relative dose intensity in patients with cancer who received adjuvant or neoadjuvant chemotherapy in community oncology practices / N. Denduluri, D.A. Patt, Y. Wang [et al.] // *JNCCN J. Natl. Compr. Cancer Netw.* – 2015. – No. 13. – P. 1383–1393.
7. Gavioli E. Prevention of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) induced bone pain using double histamine blockade / E. Gavioli, M. Abrams // *Support Care Cancer.* – 2017. – No. 25. – P. 817–822.
8. Myeloid clonogenic assays for comparison of the in vitro toxicity of alkylating agents / D. A. Volpe, M. K. Warren // *Toxicol. In Vitro.* – 2003. – No. 17. – P. 271–277.
9. Прозоровский В. Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности / В. Б. Прозоровский // *Фармакология и токсикология.* – 1962. – № 23. – С. 115–120.
10. Прозоровский В. Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований / В. Б. Прозоровский // *Психофармакология и биологическая наркология.* – 2007. – № 7. – С. 2090–2120.
11. Bhatt V. Drug-induced neutropenia – pathophysiology, clinical features, and management / V. Bhatt, A. Saleem // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 2004. – No. 34. – P. 131–137.
12. Adsorptive treatment of acute radiation sickness: Past achievements and new prospects / O. O. Shevchuk, E. A. Snezhkova, K. I. Bardakhivskaya [et al.] // *In: Hemoperfusion, Plasmapheresis and Other Clinical Uses of General, Biospecific, Immuno and Leucocyte Adsorbents.* – P. 245–256.
13. Oral melphalan pharmacokinetics – relation to dose in patients with multiple myeloma / H. Ehrsson, S. Eksborg, A. Österborg [et al.] // *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* – 1989. – No. 6. – P. 151–154.
14. Bosanquet A. G. Pharmacokinetics of oral and intravenous melphalan during routine treatment of multiple myeloma / A. G. Bosanquet, E. D. Gilby // *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* – 1982. – No. 18. – P. 355–362.

REFERENCES

1. Shevchuk, O.O., Posokhova, K.A., Sidorenko, A.S., Bardakhivska, K.I., Maslenny, V.M., Yushko, L.A., ... Nikolaev, V.G. (2014). The influence of enterosorption on some haematological and biochemical indices of the normal rats after single injection of melphalan. *Experimental Oncology*, 36 (2), 94-100.
2. Puyo, S., Montaudon, D., & Pourquier, P. (2014). From old alkylating agents to new minor groove binders. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 89 (1), 43-61. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.07.006>
3. Parkhill, A.L. (2013). Oral mucositis and stomatitis associated with conventional and targeted anticancer therapy. *Journal of Pharmacovigilance*, 01 (03). <https://doi.org/10.4172/2329-6887.1000112>
4. Al-Ansari, S., Zeche, J.A.E.M., Barasch, A., de Lange, J., Rozema, F.R., & Raber-Durlacher, J.E. (2015). Oral mucositis induced by anticancer therapies. *Current Oral Health Reports*, 2 (4), 202-211. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s40496-015-0069-4>
5. Arifa, R.D.N., Paula, T.P. de, Madeira, M.F.M., Lima, R.L., Garcia, Z.M., Ávila, T.V., ... Souza, D.G. (2016). The reduction of oxidative stress by nanocomposite Fullerol decreases mucositis severity and reverts leukopenia induced by Irinotecan. *Pharmacological Research*, 107, 102-110. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.004>
6. Denduluri, N., Patt, D. A., Wang, Y., Bhor, M., Li, X., Favret, A. M., ... Lyman, G. H. (2015). Dose delays, dose reductions, and relative dose intensity in patients with cancer who received adjuvant or neoadjuvant chemotherapy in community oncology practices. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 13(11), 1383-1393. Retrieved from: <https://doi.org/10.6004/jnccn.2015.0166>
7. Gavioli, E., & Abrams, M. (2017). Prevention of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) induced bone pain using double histamine blockade. *Supportive Care in Cancer*, 25 (3), 817-822. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/s00520-016-3465-y>
8. Volpe, D. A., & Warren, M. K. (2003). Myeloid clonogenic assays for comparison of the in vitro toxicity of alkylating agents. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 17(3), 271-277. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12781205>
9. Prozorovsky, V. B. (1962). Use of method of the smallest squares for probit analysis of lethality curves. *Farmakologia i Toksykologiya*, 23 (1), 115-120 [in Russian].
10. Prozorovsky, V. B. (2007). Statistical analysis of the results of pharmacological studies. *Psikhofarmakologia i Biologicheskaya Narkologiya*, 7 (3–4), 2090-2120 [in Russian].

11. Bhatt, V., & Saleem, A. (2004). Drug-Induced Neutropenia – Pathophysiology, Clinical Features, and Management. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 34 (2), 131–137.

12. Shevchuk, O.O., Snezhkova, E.A., Bardakhivskaya, K. ., & Nikolaev, V.G. (2017). *Adsorptive Treatment of Acute Radiation Sickness: Past Achievements and New Prospects*. In Hemoperfusion, Plasmapheresis and Other Clinical Uses of General, Biospecific, Immuno and Leucocyte Adsorbents (pp. 245-256). Retrieved from: https://doi.org/10.1142/9789814749084_0008

13. Ehrsson, H., Eksborg, S., Österborg, A., Mellstedt, H., & Lindfors, A. (1989). Oral melphalan pharmacokinetics – relation to dose in patients with multiple myeloma. *Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy*, 6 (2), 151-154. Retrieved from: <https://doi.org/10.1007/BF02985238>

14. Bosanquet, A.G., & Gilby, E.D. (1982). Pharmacokinetics of oral and intravenous melphalan during routine treatment of multiple myeloma. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 18 (4), 355-362. Retrieved from: [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(82\)90006-2](https://doi.org/10.1016/0277-5379(82)90006-2)

О. О. Шевчук

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО
МОЗ УКРАИНЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ МЕЛФАЛАНА У КРЫС

Резюме

Вступление. Гематотоксичность и поражения слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта при лечении злокачественных новообразований являются главными лимитирующими факторами эффективного лечения и часто стают причиной прерывания и отсрочки химиотерапии. Поиск новых эффективных лекарственных средств, биоматериалов и веществ для смягчения и уменьшения интенсивности побочных реакций противоопухолевой химиотерапии чрезвычайно актуален. Для их апробации и проведения доклинических исследований необходима модель, воссоздающая типические побочные эффекты полихимиотерапии. Известно, что наиболее выраженное токсическое влияние на костный мозг и желудочно-кишечный тракт (а именно слизистые оболочки) имеют алкилирующие противоопухолевые средства со свойствами радиомиметиков.

Цель исследования – провести скрининговые исследования с применением цитостатика мелфалана с целью определения основных параметров токсичности и дальнейшей апробации в качестве модели цитостатической миелодепрессии для выполнения дальнейших доклинических исследований.

Методы исследования. Исследование выполнено на половозрелых крысах, которые были разделены на группы. Животным ввели один раз в хвостовую вену мелфалан в дозах 3, 6, 9 и 12 мг/кг. Основные показатели острой токсичности (летальная доза LD_{50} , $1/LD_{50}$ – абсолютная токсичность, LD_{84}/LD_{16} – зона острого токсического действия, $1/(LD_{50} - S)$ – суммарный показатель токсичности и S – функция угла наклона (вариабельность смертельных доз)) определяли методом наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности по В. Б. Прозоровскому и по методу Финни с использованием программы StatPlus 2009 Professional 5.8.4.

Результаты и обсуждение. Как свидетельствуют данные регрессионного анализа по методу Финни, LD_{50} составляла $(4,22 \pm 0,62)$ мг/кг (нижняя граница LD_{50} – 3,10 мг/кг, а верхняя – 5,49 мг/кг). Показатели по методу Прозоровского: LD_{50} мелфалана при однократном внутривенном введении – $(4,765 \pm 1,003)$ мг/кг (от 2,63 мг/кг (нижняя граница) до 6,90 мг/кг (верхняя граница)).

Вывод. Для проведения экспериментов, апробации модели цитостатической миелодепрессии и дальнейшего изучения влияния факторов коррекции на состояние костного мозга и показатели периферической крови было выбрано дозу мелфалана 3 мг/кг однократно внутривенно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мелфалан; острая токсичность; крысы; LD_{50} .

STUDY OF SOME ACUTE TOXICITY INDICATORS OF MELPHALAN IN RATS

Summary

Introduction. Bone marrow suppression and gastro-intestinal toxicity are the main limiting factors for treatment of oncological patients and may cause its delaying and disruption. So, search of new effective drugs, biomaterials and substances to ameliorate side effects of anticancer chemotherapy remains actual problem. To study their protective capacity and for preclinical study we require the relevant animal model. It is known that alkylating agents possess the most toxic effect on bone marrow and mucus membranes of intestine and have radiomimetic properties.

The aim of the study – screening studies to define the main parameters of acute toxicity of melphalan in rats for further use as an animal model of cytostatic myelodepression for preclinical studies.

Research Methods. Experiments were performed on inbred rats, which were randomized into 4 groups. Melphalan at the dose of 3, 6, 9 and 12 mg/kg was injected one time intravenously into the tail vein. The main acute toxicity indicators, namely median lethal dose LD_{50} , $1/LD_{50}$ – absolute toxicity, LD_{84}/LD_{16} – zone of acute toxic effects, $1/(LD_{50}-S)$ – the total indicator of toxicity and S – function of the inclination angle (lethal doses variability), were measured by Finney method and method offered by V. V. Prozorovskyi using software StatPlus 2009 Professional 5.8.4.

Results and Discussion. According to the regression analysis by Finney method LD_{50} is (4.22 ± 0.62) mg/kg (lower limit LD_{50} – 3.10 mg/kg, higher limit – 5.49 mg/kg). Indicator of LD_{50} is (4.765 ± 1.003) mg/kg (from 2.63 to 6.90 mg/kg) according to the method proposed by Prozorovskyi in single intravenous injection.

Conclusions. The dose of 3 mg/kg of melphalan as a single intravenous injection was chosen for further experiments and as a model of cytostatic myelodepression for preclinical studies.

KEY WORDS: melphalan; acute toxicity; rats; LD_{50} .

Отримано 11.10.19

Адреса для листування: О. О. Шевчук, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, майдан Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: shevchukoo@tdmu.edu.ua.