

Повреждающее действие аконитинсодержащего агента на сосудистую систему паренхиматозных органов мышей и крыс

О.И.Дасюкевич, О.В.Юрченко, Г.И.Соляник

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины
Киев, Украина

Проведены исследования острой токсичности аконитинсодержащего агента ВС1, высокая противоопухолевая и антиметастатическая активность которого была продемонстрирована в отношении опухолей с ангиогенеззависимым ростом. Показано, что токсические проявления ВС1 в летальных и сублетальных дозах сопровождаются существенными изменениями гистологической структуры паренхиматозных органов. При этом значительное повреждающее действие ВС1 оказывает на сосудистую систему, расширяя кровеносные сосуды, увеличивая их проницаемость или обуславливая их разрывы. Антиваскулярное и антиангиогенное действие ВС1 лежит в основе и противоопухолевой активности данного агента и связано с его непосредственным влиянием на эндотелиальные клетки.

Ключевые слова: аконитинсодержащие агенты, острая токсичность.

ВВЕДЕНИЕ

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].

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, играющих важную роль в выживании клеток и их функциональной активности [2]. В особенности это касается таких нормальных клеток, как эндотелиальные, электрокинетические характеристики которых являются определяющими в процессе морфогенеза сосудов. В этой связи можно было ожидать, что аконитинсодержащие биологически активные вещества могут проявлять способность к ингибированию опухолевого ангиогенеза. Это было подтверждено результатами доклинических исследований специфической фармакологической активности аконитинсодержащих агентов, которые продемонстрировали их способность тормозить рост первичных опухолей и значительно ингибировать процесс метастазирования, уменьшая как количество метастазов, так и объем метастатического поражения [3]. При этом в низких дозах аконитинсодержащие агенты проявляли противоопухолевое действие только в отношении опухолей с ангиогенеззависимым ростом [4]. Создание нового противоопухолевого препарата с антиангиогенным механизмом действия на основе аконитинсодержащих агентов с необходимостью предполагает исследование его безопасности, первым этапом которого является изучение острой токсичности.

В этой связи целью данной работы было исследование токсичности аконитинсодержащего агента после его однократного введения в летальных и сублетальных дозах. Особое внимание в работе уделялось морфологическим исследованиям внутренним органов животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования были выполнены на крысах-самках линии Wistar средней массой 190-210 г и мышах-самках линии C57Bl/6 в возрасте 2-2,5 мес. массой 19-21 г (разводки вивария Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е.Кавецкого НАН Украины). Работы на животных проводились в соответствии с общепринятыми международными правилами проведения работ с экспериментальными животными [5].

Все подопытные мыши линии C57Bl/6 и крысы линии Wistar после прохождения 7-дневного карантина были разделены на группы, рандомизированные по массе. Перед введением тест-агента крысы голодали на протяжении ночи, мыши — 4 часа.

В качестве аконитинсодержащего агента использовали биологически активную добавку ВС1 производства НПФ «Аксомед», которая представляет собой порошок белого цвета с желтоватым оттенком, содержащий в 1 г 150 мкг аконитина.

Дозирование агента ВС1 проводилось по содержанию в нем аконитина в расчете на массу животного. Исходя из результатов предварительных исследований и основываясь на литературных данных, острая токсичность изучалась в прогрессивно убывающих дозах в диапазоне 8,0-1,0 мкг/г (для мышей) и в диапазоне 2,5-0,5 мкг/г (для крыс).

Фармацевтическая форма препарата предполагает только пероральное его введение. Водный раствор ВС1 готовили *ex tempore* непосредственно перед введением. Растворы готовились таким образом, чтобы животные во всех группах получали одинаковое количество жидкости. Необходимую дозу препарата вводили однократно: крысам — в 3 мл воды, мышам — в 0,3 мл. Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней с момента введения препарата.

Для исследования токсических свойств ВС1 по отношению к крысам и мышам было сформировано по шесть групп животных. К — контрольные животные, получавшие воду, и с 1 по 5 группу — животные, получавшие ВС1 в прогрессивно уменьшающейся дозе.

Длительность эксперимента составила две недели. Клинические проявления острой токсичности оценивали по интенсивности и характеру дыхания, двигательной активности, наличию судорог, пиелоэрекции, тону мышц, состоянию кожи. Проводилось исследование

динамики изменения веса животных в процессе наблюдения.

Морфологические исследования влияния ВС1 проводили в четырех группах животных (для каждого вида животных), получавших ВС1 в летальных (или сублетальных дозах), субтоксических и нетоксических дозах, и животных контрольных групп. При этом проводились морфологические исследования ткани легкого, печени, почки и сердца подопытных животных. Подлежащие морфологическому исследованию ткани фиксировали в 4% растворе забуференного формалина и заливали в парафин. Из парафиновых блоков были изготовлены гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилин-эозином и исследовали в световом микроскопе.

В качестве контроля были использованы интактные животные аналогичных линий, пола, возраста и веса, которые получили *per os* воду в том же объеме, что и исследуемые животные.

Статистический анализ проводили с использованием дескриптивных методов и статистических критериев. Математический анализ зависимости выживаемости животных (в долях от общего количества — V) от дозы ВС1 (D) проводили с помощью математической модели

$$V = \exp(a(D - DL_0)),$$

параметры которой определяли в рамках системы Origin-7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований влияния аконитинсодержащего агента ВС1 на организм экспериментальных животных после однократного перорального его введения установлено, что токсические проявления (независимо от вида животных) носили дозозависимый характер и были летальными при максимальных исследуемых дозах. Следует подчеркнуть, что гибель животных наблюдалась только на протяжении первого часа после введения ВС1 и полностью отсутствовала на более поздних сроках, что указывает на низкую кумулятивную токсичность этого агента.

Анализ динамики гибели животных позволил определить значения средней летальной дозы и максимальной переносимой дозы (МПД) (табл. 1). Как видно из табл. 1, доза ВС1, при которой наблюдается гибель половины животных (LD_{50}), только в 2 раза выше МПД, что указывает на достаточно узкий дозовый диапазон летальной токсичности данного агента.

ТАБЛИЦА 1
Дозовые показатели летальной токсичности ВС1

Вид животных	LD ₅₀ (мкг/г)	МПД (мкг/г)
Мыши линии С57Bl/6	2,9±0,53	1,8±0,4
Крысы линии Wistar	1,56±0,11	0,95±0,07

Следует отметить, что значение МПД для крыс, рассчитанное на основании МПД для мышей с применением формулы видового пересчета [6], практически полностью совпадало с данными, полученными в остром опыте, что дает основания использовать эти формулы при определении диапазона токсических и терапевтических доз для клинических исследований.

Внешние клинические проявления острой токсичности агента ВС1 у мышей и крыс практически полностью совпадали и были характерными для нейротоксинов, к которым относится аконитин. Известно, что алкалоиды аконитинового ряда обладают судорожно-паралитическим действием, которое обусловлено стойким повышением натриевой проницаемости возбудимых (нервных и мышечных) мембран и их деполяризации вследствие этого. Проведенные нами исследования показали, что в первые минуты после введения ВС1 животные становились беспокойными, увеличивалась спонтанная двигательная активность. Дыхание учащалось и носило поверхностный характер. Отмечалась выраженная устойчивая пиелозрекция. Спустя непродолжительное время (5-15 мин.) активные движения животных сменялись на замедленные, заторможенные. Учащенное поверхностное дыхание становилось все более редким с усиливающимися проявлениями диспноэ и апноэ. На этом этапе были видны проявления цианоза на слизистых ротовой полости, подушечках лап и хвосте.

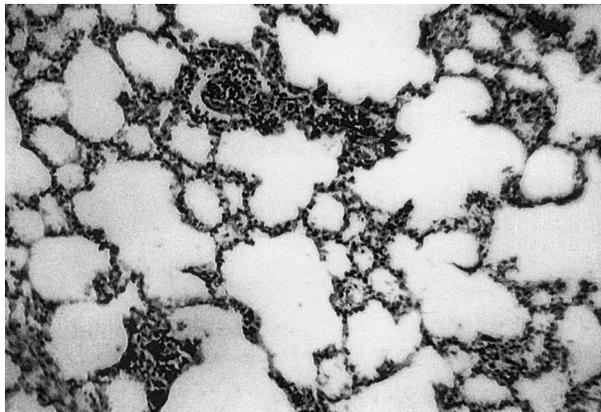


Рис. 1. Морфологическое строение легкого крыс, погибших в течение часа после воздействия ВС1. Ув.200.

В терминальной стадии наступали асфиксические судороги, и животное погибало.

Интересно, что микроскопические исследования внутренних органов животных, которые погибли в первый час после введения ВС1, выявили существенные повреждения их гистологической структуры (сходные для крыс и мышей), напрямую не связанные с влиянием аконитина на нервные клетки и миоциты. Наиболее выраженными эти изменения были в тканях легкого, печени, селезенки и сердца в сравнении с аналогичными органами интактных животных.

Так, у крыс, получавших ВС1 в максимальной исследуемой дозе (в 2,2 раза выше МПД) и погибших в первый час после введения агента, в ткани легкого, печени, селезенки, сердца наблюдалось резкое расширение кровеносных сосудов и заполнение их большим количеством эритроцитов. В ткани легкого эритроциты обнаруживались также между альвеолярными клетками, что приводило к потере контактов между ними. Единичные эритроциты также располагались в альвеолярных ходах легкого (рис. 1).

В ткани печени крыс большое количество эритроцитов отмечалось между гепатоцитами. Пространства между трабекулами были расширены и также заполнены эритроцитами. Если в расширенных кровеносных сосудах эритроциты лежали отдельно друг от друга, то между трабекулами отмечался сладж-феномен, когда эритроциты были тесно прижаты друг к другу и их границы не определялись (рис. 2).

Для ткани почек исследованных крыс зафиксировано расширение кровеносных сосудов. Значительное количество эритроцитов находилось как в клубочках, так и между канальцами, более того, выявлено наличие эритроцитов между эпителиальными клетками канальцев. Перечисленные изменения были ха-

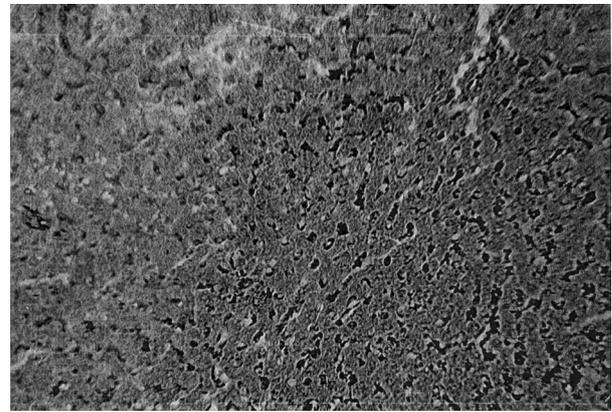


Рис. 2. Морфологическое строение печени крыс, погибших в течение часа после воздействия ВС1. Ув.200.

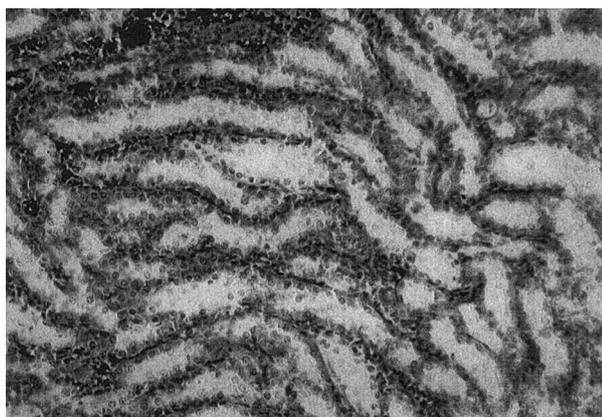


Рис. 3. Морфологическое строение почки крыс, погибших в течение часа после воздействия ВС1. Ув.200.

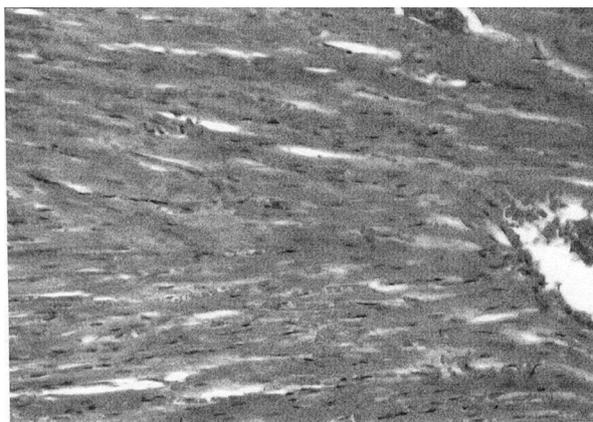


Рис. 4. Морфологическое строение сердца крыс, погибших в течение часа после воздействия ВС1. Ув.200.

рактерными как для коркового, так и для мозгового слоя почек (рис. 3). Сердечная ткань крыс, погибших после введения ВС1 в максимальной дозе, характеризовалась резким расширением кровеносных сосудов, заполненных эритроцитами. Часто отмечались явления гиалиноза, наблюдались разрывы стенок сосудов, и небольшие скопления эритроцитов располагались между кардиоцитами (рис. 4).

Следует отметить, что аналогичные нарушения внутренних органов наблюдались также и у крыс, которые получили тест-агент ВС1 в более низких дозах, но степень выраженности этих нарушений уменьшалась с понижением дозы и не носила летальный характер для животных.

При микроскопическом исследовании внутренних органов мышей, подвергшихся воздействию ВС1 в максимальной исследуемой дозе (для мышей она была в 2,4 раза выше МПД) установлены аналогичные патологические изменения, однако степень выраженности их была меньшей, чем у крыс, за исключением ткани легкого, где кровоизлияния были очень обширными и затрагивали все структурные элементы органа. Степень выраженности морфологических изменений падала с понижением дозы.

Таким образом, исследования внутренних органов животных показали, что ВС1 существенно влияет на сосудистую систему (как в сублетальных, так и более низких дозах), или нарушая проницаемость стенок сосудов, или повреждая их.

Следует отметить, что такой характер повреждения сосудистой системы при действии ВС1 лежит в основе его противоопухолевого действия. Так, ранее нами было показано, что тест-агент ВС1 проявляет выраженную противоопухолевую активность в отношении солид-

ных опухолей, рост которых существенно зависит от степени васкуляризации. При этом противоопухолевый эффект носил дозозависимый характер. Наиболее выраженное противоопухолевое действие наблюдалось при сравнительно высоких суммарных дозах ВС1 (близких к МПД/2), а также при крайне низких (более чем в 20 раз ниже, чем МПД), что связано с реализацией двух принципиально отличающихся механизмов противоопухолевого действия ВС1 [4, 7]. При высоких дозах реализуется прямое цитотоксическое действие ВС1 на эндотелиальные клетки с преимущественным поражением активно пролиферирующего пула этих клеток (антиваскулярное действие). При низких (нецитотоксических дозах) аконитинсодержащие агенты существенно изменяют электрокинетические характеристики эндотелиоцитов (вплоть до инверсии поверхностного заряда этих клеток) и, как следствие, препятствуют формированию новых кровеносных сосудов (антиангиогенное действие) [8-10]. Несмотря на существенные отличия, оба механизма обуславливают как минимум значительное увеличение проницаемости стенок сосудов вплоть до нарушения их целостности с последующим выходом форменных элементов крови в межклеточное пространство. Именно такие нарушения наблюдались нами в нормальных органах и тканях животных, получивших аконитинсодержащий агент ВС1.

Следует подчеркнуть, что при выраженном противоопухолевом антиангиогенном действии аконитинсодержащих агентов токсическое их влияние на организм незначительно в силу низкой интенсивности процессов неоваскуляризации в нормальных органах и тканях взрослого организма по сравнению с опухолевой тканью.

ВЫВОДЫ

Проведенные исследования показали, что токсические проявления аконитинсодержащего агента в летальных и сублетальных дозах сопровождаются существенными изменениями гистологической структуры внутренних органов. Значительное повреждающее действие ВС1 оказывает на сосудистую систему, расширяя кровеносные сосуды, увеличивая их проницаемость или обуславливая их разрывы. Антиангиогенное и антиангиогенное действие ВС1 лежит в основе и противоопухолевой активности данного агента и связано с его непосредственным влиянием на эндотелиальные клетки. При выраженном противоопухолевом антиангиогенном действии аконитинсодержащих агентов (которое реализуется при низких дозах) токсическое их влияние на сосудистую систему организма незначительно в силу низкой интенсивности процессов неоваскуляризации в нормальных органах и тканях взрослого организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors // Ann. Surg. — 1972. — Vol. 175. — P. 409-416.
2. Gutser U., Friese J., Neubach J. et. al. Mode of antiproliferative and toxic action of alkaloids of Aconitum spec // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. — 1998. — Vol. 357 — P. 39-48.
3. Дасюкевич О.Й., Колесник Д.Л., Пясковская О.Н. и др. Аконитинсодержащий агент ВС1 проявляет выраженное противоопухолевое и антиметастатическое действие в отношении опухолей с ангиогенеззависимым ростом / Тезисы докладов Научно-практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», 25-30 мая 2009 г., Новый Свет, Украина. — К.: Издатель В.С.Маргынчук, 2009. — 251 с.
4. Solyanik G.I., Fedorchuk A.G., Pyaskovskaya O.N. et al. Anticancer activity of aconitine-containing herbal extract BC1 // Exp. Oncol. — 2004. — Vol. 26. — P. 307-311.
5. Кожемякін Ю.М., Хромов О.С., Филоненко М.А. та ін. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. — Київ, 2002. — 156 с.
6. Уланова И.П., Сидоров К.К., Халепо А.И. К вопросу об учете поверхности тела экспериментальных животных при токсикологическом исследовании / Под ред. А.А.Летавета и И.В.Саноцкого. — Л.: Медицина, 1968. — Вып.10. — С. 18-25.
7. Dasyukevich O.I., Solyanik G.I. Comparative study of anticancer efficacy of aconitine-containing agent BC1 against ascite and solid forms of Ehrlich's carcinoma // Exp. Oncol. — 2007. — Vol. 29. — P. 317-319.
8. Garmanchuk L.V., Pyaskovskaya O.N., Yahish Yu.V. et. al. Influence of aconitine-containing herbal extract BC1 on proliferative and electrokinetic characteristics of endothelial cells // Exp. Oncol. — 2005. — Vol. 27. — P. 262-266.
9. Пясковская О.Н., Яниш Ю.В., Колесник Д.Л. и др. Влияние аконитинсодержащего агента ВС1 на электрокинетические характеристики опухолевых клеток // Біофізичний вісник. — 2008. — Т.21, №2. — С. 35-41.
10. Колесник Л., Яниш Ю.В., Дасюкевич О.Й та ін. Дослідження впливу аконітинвмісного рослинного агенту ВС1 на електрокінетичні властивості варіантів клітин карциноми Льюїс з різним метастатичним потенціалом / Тези ІХ Міжнародної конференції молодих онкологів «Сучасні проблеми експериментальної і клінічної онкології», 23-24 квітня 2008 р., Київ, Україна. — К.: ДІА, 2008. — С. 66.

О.Й.Дасюкевич, О.В.Юрченко, Г.І.Солянік.
Пошкоджуюча дія аконітинвмісного агента на судинну систему внутрішніх органів мишей та щурів. Київ, Україна.

Ключові слова: аконітинвмісний агент ВС1, гостра токсичність.

Проведені дослідження гострої токсичності аконітинвмісного агента ВС1, висока протипухлинна та антиметастатична активність якого була продемонстрована стосовно пухлин з ангиогенеззалежним ростом. Показано, що токсичні прояви ВС1 в летальних та сублетальних дозах супроводжуються суттєвими змінами гістологічної структури паренхіматозних органів. При цьому значну пошкоджуючу дію ВС1 має на судинну систему, розширюючи кровеносні судини, збільшуючи їх проникність чи викликаючи їх розриви. Антиангиогенна та антиангіогенна дія ВС1 лежить в основі і протипухлинної активності даного агента й пов'язана з його безпосереднім впливом на ендотеліальні клітини.

O.I.Dasyukevich, O.V.Yurchenko, G.I.Solyanik.
Aconitine-containing agent injuring influence on the blood vessels of internal organs in mice and rats. Kyiv, Ukraine.

Key words: aconitine-containing agents, acute toxicity.

Acute toxicity of aconitine-containing agent BC1, which possesses high antitumor and antimetastatic activity against tumors with angiogenesis-dependent growth, has been studied. It has been shown that toxic effects of BC1 in lethal and sublethal doses were accompanied by the significant changes in histological structure of parenchymatous organs. BC1 damaging action toward blood vessels manifested in itself in vasodilatation, enhancement of vascular permeability and rupture of blood vessels. Such antivasular and antiangiogenic action of BC1 underlies its antitumor activity and is associated with direct effect on endothelial cells.

Надійшла до редакції 05.12.2011 р.