

Министерство здравоохранения Республики Беларусь
Учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»

**О биологическом действии фармацевтической
субстанции золедроновая кислота**

Лепешко П.Н.,
старший преподаватель кафедры гигиены труда

Минск 2021

Фармацевтическое направление, призванное обеспечить население страны своевременной и высококачественной медицинской помощью, является ответственным и важным разделом здравоохранения. В настоящее время в Республике Беларусь расширяется производство ассортимента лекарственных средств отечественных фармацевтических компаний, которые имеют хороший потенциал для развития как внутри страны, так и на внешних рынках. К числу перспективных лекарственных средств относится золедроновая кислота, являющаяся основой производства отечественного лекарственного средства, в связи с чем возникла необходимость проведения токсикологических исследований данной фармацевтической субстанции для установления особенностей ее биологического действия, особенно при ингаляционном поступлении, с последующей разработкой гигиенического норматива содержания золедроновой кислоты в воздухе рабочей зоны.

Золедроновая кислота – бисфосфонат третьего поколения, обладающий избирательным действием на костную ткань. Золедроновая кислота относится к группе корректоров метаболизма в костной и хрящевой ткани по клинической классификации, по химическому строению представляет собой производное азотсодержащих бисфосфонатов. Антирезорбтивный механизм золедроновой кислоты в настоящее время полностью не ясен, но связан с ингибированием мевалонатного пути биосинтеза холестерина за счет ингибирования фарнезилпирофосфатсинтетазы и нарушения пренилирования G-белков в остеокласте. В результате происходит дезорганизация цитоскелета остеокластов, утрачивается его щеточная каемка, с помощью которой он присоединяется к месту резорбции кости, нарушается внутриклеточное движение везикул и ускоряется апоптоз, что и определило применение золедроновой кислоты для лечения остеопороза и профилактики злокачественной гиперкальциемии и костных метастазов при злокачественных опухолях.

Материалы и методы. Токсиколого-гигиеническое изучение образца препарата выполнено в соответствии с инструкциями 1.1.11-12-206-2003 «Гигиеническое нормирование лекарственных средств в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест и воде водных объектов», 1.1.11-12-35-2004. «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ». Экспериментальные группы животных (белые крысы и белые мыши) формировали методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя, при этом разность в массе тела животных составляла не более 10 %. Работа выполнена с соблюдением правил гуманного отношения к животным в соответствии с принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в эксперименте (1986).

Острое отравление моделировали при воздействии водного раствора золедроновой кислоты с последующим наблюдением в течение 14 суток и регистрацией симптомов клинической картины отравления.

Основным критерием токсического действия для определения среднесмертельных концентраций и доз (DL_{50} и CL_{50}) являлась гибель животных. Среднесмертельные дозы и концентрация устанавливались при статистической обработке результатов острых опытов с использованием метода пробит-анализа J.T.Litchfield, F.H.Wilcoxon (1949).

Установление порога хронического действия проводилось на белых крысах путем ежедневного 5 раз в неделю 4-х месячного ингаляционного воздействия золедроновой кислоты в концентрациях $0,1 \text{ мг/м}^3$, $0,05 \text{ мг/м}^3$, $0,01 \text{ мг/м}^3$ (1, 2 и 3 опытные группы соответственно). Через 2 месяца после начала эксперимента, по окончании эксперимента и через 2 месяца восстановительного периода использовали комплекс физиологических, гематологических, клинико-биохимических и иммунологических методов и тестов (всего более 60 показателей) для выявления особенностей биологического действия субстанции.

Результаты и обсуждения. Клиническая картина *острого отравления* при внутрижелудочном введении золедроновой кислоты у крыс и у мышей проявлялась в общей заторможенности и гиподинамии на 3-4 сутки при воздействии доз выше 100 мг/кг . На 4-5 сутки после воздействия у лабораторных животных развивался паралич с последующей гибелью. При внутрибрюшинном введении клиническая картина острого отравления не отличалась и развивалась на 5-6 сутки при воздействии доз выше 5 мг/кг с последующей гибелью части животных в более поздние сроки на 6-9 сутки. Внешние признаки интоксикации у выживших животных исчезали на 13-14 сутки после введения препарата (таблица 1).

Таблица 1 – Параметры острой токсичности золедроновой кислоты при однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении

Вид животных	Метод введения	Величины летальных доз, мг/кг			Показатели потенциальной опасности острого отравления	
		DL_{16}	DL_{50}	DL_{84}	S	R
Мыши	внутрижелудочно	23	$123,8 \pm 37,8$	227	3,6	9,87
	внутрибрюшинно	6,1	$14,3 \pm 5,6$	19,7	1,82	3,23
Крысы	внутрижелудочно	48,8	$104,9 \pm 17,4$	171,2	1,91	3,51
	внутрибрюшинно	4,1	$12,5 \pm 3,8$	24,5	2,62	5,98

Примечания: DL_{16} - доза, вызывающая 16% летальных исходов; DL_{50} - доза, вызывающая 50% летальных исходов (среднесмертельная); DL_{84} - доза, вызывающая 84% летальных исходов; S - функция угла наклона прямой "доза-эффект"; R - размах летальных доз (отношение DL_{84}/DL_{16})

При изучении токсических эффектов химических соединений нередко возникает необходимость установления параметров времени гибели подопытных животных. Для этой цели для каждого вида животных рассчитывали среднеэффективное время наступления летальных исходов (ET₅₀) по испытанной дозе, величина которой наиболее приближена к полученной DL₈₄. Для золедроновой кислоты среднеэффективное время при внутрижелудочном введении составило около 5 суток для белых крыс и мышей, а при внутрибрюшинном введении – 8,90 суток для белых мышей и 6,10 суток для белых крыс.

В эксперименте на белых крысах при однократном ингаляционном поступлении золедроновой кислоты была установлена среднесмертельная концентрация исследуемой фармацевтической субстанции в воздухе. Для этого проводили ингаляционное воздействие золедроновой кислотой на лабораторных животных в концентрациях от 100 мг/м³ до 450 мг/м³. Клиническая картина острого отравления проявлялась в общей заторможенности и гиподинамии на 5-6 сутки при воздействии концентраций выше 176 мг/м³. На 7-8 сутки отмечались боковое положение тела животного и отсутствие реакции на прикосновение с последующей гибелью части крыс. Внешние признаки интоксикации у выживших животных исчезали на 12-14 сутки после введения препарата. Среднесмертельная концентрация при ингаляционном воздействии фармацевтической субстанции золедроновая кислота для белых крыс составила 233,7 ± 39,2 мг/м³, среднеэффективное время гибели животных – 7,5 ± 1,4 суток.

Таким образом, при изучении параметров острой токсичности было установлено, что фармацевтическая субстанция золедроновая кислота представляет опасность при ингаляционном воздействии и относится к первому классу опасности (чрезвычайно опасные вещества) по ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» и первому классу токсичности (чрезвычайно токсично) по ТКП 125-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика» (таблица 2).

Таблица 2 – Установление класса опасности золедроновой кислоты по параметрам острой токсичности

Показатель	Вид животных	Значение	Класс опасности	Класс токсичности
DL ₅₀ в/ж, мг/кг	Крысы	104,9	2	3
	Мыши	123,8	2	3
DL ₅₀ в/б, мг/кг	Крысы	12,5	-	3
	Мыши	14,3	-	3
CL ₅₀ , мг/м ³	Крысы	233,7	1	1

При изучении особенностей биологического действия при *хроническом ингаляционном поступлении* золедроновой кислоты в первой опытной группе (действующая концентрация $0,1 \text{ мг/м}^3$) через 2 месяца после начала воздействия отмечались следующие статистически значимые по сравнению с контрольной группой изменения: в сыворотке крови снижение содержания хлоридов на 3% и активности АЛТ на 17,8 %, увеличение содержания белка на 5,3 %; в моче увеличение рН на 32 % и снижение содержания мочевины на 9,8 %. Также обнаружено появление следов белка в моче и статистически значимое снижение по сравнению с контролем относительного коэффициента массы печени на 23 % и увеличение относительного коэффициента массы надпочечников на 39 %.

Во второй опытной группе лабораторных животных через 2 месяца ингаляционного воздействия золедроновой кислоты в концентрации $0,05 \text{ мг/м}^3$ обнаружено статистически значимое по сравнению с контролем увеличение содержания белка в сыворотке крови на 2,9 %; увеличение рН мочи на 32 % и снижение содержания мочевины в ней на 9,8 %. Обнаружено появление следов белка в моче, снижение массы печени на 21,7 % и увеличение относительного коэффициента массы надпочечников на 39 % (указанные изменения менее выражены, чем в 1 опытной группе).

В третьей опытной группе (концентрация субстанции $0,01 \text{ мг/м}^3$) через 2 месяца воздействия статистически значимых изменений по сравнению с контролем было меньше: увеличилось рН мочи на 32 % и снизился относительный коэффициент массы печени на 14 %.

По окончании хронического 4-месячного эксперимента при ингаляционном воздействии золедроновой кислоты в концентрации $0,1 \text{ мг/м}^3$ отмечалось статистически значимое по сравнению с контролем увеличение объема эритроцита на 6 % и содержания гемоглобина в эритроците на 7 %, снижение активности АЛТ и повышение активности АСТ на 12,5 %, увеличение содержания мочевины в сыворотке крови на 20 %, снижение рН мочи на 10 %, увеличение относительного коэффициента массы почек на 13 %, увеличение содержания мочевины в моче на 19 % и увеличение содержания хлоридов в моче на 38 %.

При воздействии концентрации равной $0,05 \text{ мг/м}^3$ (2 опытная группа) обнаружено статистически значимое по сравнению с контролем аналогичное увеличение объема эритроцита и снижение содержания гемоглобина в нем (6 % и 7 %) и снижение активности АСТ (12,5 %); снижение активности АЛТ на 18,8 %, сохранилось присутствие белка в моче. Со стороны мочевыделительной системы выявлены такие же статистически значимые изменения как и в 1 опытной группе, но менее выраженные (снижение рН мочи на 6,7 %, увеличение относительного коэффициента массы почек на 12 % и увеличение содержания хлоридов в моче на 23,9 %).

При статистической обработке результатов хронического ингаляционного воздействия золедроновой кислоты в концентрации $0,01 \text{ мг/м}^3$ (3 опытная группа) было обнаружено только увеличение содержания хлоридов в моче на 23,9 % ($p < 0,05$).

Количество и выраженность изменений клинико-биохимических и морфологических показателей при хроническом ингаляционном воздействии в исследуемых концентрациях свидетельствует о дозозависимых эффектах действия золедроновой кислоты.

При изучении иммунотоксических свойств было установлено, что хроническое ингаляционное воздействие золедроновой кислоты в исследуемых концентрациях не оказало существенное влияние на функциональную бактерицидную способность гранулоцитарно-макрофагальных клеток крови опытных животных, поскольку спонтанные уровни индукции в клетках активных форм кислорода не имели значимых отличий от контрольных. Неспецифическая стимуляция гранулоцитарно-макрофагальных клеток опсонизированным зимозаном сопровождалась высокими уровнями продукции активных форм кислорода в фагоцитах крови как опытных, так и контрольных животных. Вследствие этого в гранулоцитах крови всех групп животных определяли достаточно высокую величину фагоцитарного резерва.

Специфическая стимуляция гранулоцитарно-макрофагальных клеток крови сопровождалась повышенной активацией кислородного метаболизма у животных 1 и 2 опытной группы, однако как абсолютные показатели реакции специфического НСТ-теста, так и интегральные показатели, не существенно превышали таковые в контрольной группе, что свидетельствует о весьма слабой потенциальной аллергенной активности препарата.

Спустя 2 месяца восстановительного периода (после прекращения 4-месячного воздействия золедроновой кислоты) в первой опытной группе отмечалось статистически значимое по сравнению с контролем уменьшение содержание гемоглобина и показателя гематокрита на 5,4 % и 5,0 % соответственно, снижение содержание креатинина в сыворотке крови на 6,6 %, уменьшение активности АСТ на 22,2 %. Сохранились изменения в мочевыделительной системе (снижение относительного коэффициента массы почек на 11 %, снижение содержания в моче хлоридов (на 12,9 %) и уровня креатинина (на 24,8 %). Кроме этого в моче лабораторных животных были обнаружены следы белка, со стороны крови – абсолютный и относительный лимфоцитоз.

Во второй опытной группе сохранился лимфоцитоз, который был менее выражен, чем в 1 группе; а также статистически значимо по сравнению с контролем снизилось содержание креатинина в сыворотке крови и моче на 6,6 % и 12,3 % соответственно.

В третьей опытной группе было отмечено только снижение содержания креатинина в сыворотке крови на 6,6 % ($p < 0,05$).

На основании анализа полученных данных изменений морфофункциональных показателей белых крыс, подвергшихся 4-х месячному ингаляционному поступлению золедроновой кислоты в концентрациях $0,01 \text{ мг/м}^3$, $0,05 \text{ мг/м}^3$ и $0,1 \text{ мг/м}^3$, установлен порог хронического действия золедроновой кислоты по содержанию хлоридов в моче на уровне $0,01 \text{ мг/м}^3$.

Рассчитанная зона хронического действия золедроновой кислоты составила 3000, что позволило отнести данную фармацевтическую субстанцию к 1 классу опасности (чрезвычайно опасные вещества) по ГОСТ 12.1.007-76.

Заключение. На основании проведенных исследований установлено, что золедроновая кислота, предназначенная для лечения злокачественной гиперкальциемии и профилактики костных метастазов при различных опухолях, относится к чрезвычайно опасным и чрезвычайно токсичным веществам (1 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности», 1 класс токсичности по ТКП 125-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика»), а также обладает гемотоксическим действием, оказывает влияние на функциональное состояние почек и печени и имеет слабую потенциальную аллергенную активность.

В качестве гигиенического норматива утверждена предельно допустимая концентрация золедроновой кислоты в воздухе рабочей зоны без числового значения с обозначением «²» – должен быть исключен контакт с органами дыхания и кожей при обязательном контроле воздуха рабочей зоны на уровне чувствительности не менее $0,001 \text{ мг/м}^3$ с отметкой «а» (аэрозоль), 1 класс опасности.

С целью обеспечения безопасных условий труда работающих на производстве золедроновой кислоты организация технологического процесса должна исключать контакт с органами дыхания путем использования технологических и санитарно-технических профилактических мероприятий (использование коллективных и индивидуальных средств защиты).