

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ ЦИКЛОФОСФАМИД

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Фармацевтический рынок является стратегически важным сектором экономики, основой ее безопасности в области здравоохранения, лекарственного и медико-технического обеспечения. Сохранение и улучшение здоровья населения как важнейшей составляющей национальной безопасности требует исключения критической зависимости лекарственного обеспечения населения от внешней экономической конъюнктуры. В связи с этим в нашей стране была сформирована Государственная программа развития фармацевтической промышленности Республики Беларусь на 2016–2020 гг., мероприятиями которой предполагается создание генерических и инновационных лекарственных средств для лечения заболеваний, имеющих наиболее высокую летальность. В связи с этим в фармацевтической отрасли промышленности Республики Беларусь значительно расширяется ассортимент выпускаемой продукции, что определяет потребность в создании безопасных условий труда работающих. Цель исследований – экспериментальным путем в острых опытах определить параметры токсикометрии для установления класса опасности и дальнейшего гигиенического нормирования фармацевтической субстанции циклофосфамид. В острых экспериментах на различных видах лабораторных животных были установлены среднесмертельные дозы при внутрижелудочном и внутривнутрибрюшинном введении, среднесмертельная концентрация, порог и зона острого действия фармацевтической субстанции циклофосфамид. Установлено, что циклофосфамид относится к чрезвычайно опасным веществам по ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» и чрезвычайно токсичным веществам по ТКП 125-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика». С целью обеспечения безопасных в гигиеническом отношении условий труда работающих на производстве циклофосфамида с учетом экспериментально выявленных особенностей его острого биологического действия организация технологического процесса должна обеспечить невозможность попадания в воздух рабочей зоны фармацевтической субстанции для исключения контакта с органами дыхания работающих.

Ключевые слова: циклофосфамид, цитостатики, токсикология, параметры острой токсичности, гигиеническое нормирование, класс опасности.

P. N. Liapioshka, I. P. Siamionau

ACUTE TOXICITY OF PHARMACEUTICAL SUBSTANCES CYCLOPHOSPHAMIDE

The pharmaceutical market is a strategically important sector of the economy, the basis of its security in the field of health, medical and technical support. The preservation and improvement of public health as an essential component of national security requires the elimination of the critical dependence of the drug supply of the population on the external economic situation. In this regard, our country was formed the State program of development of pharmaceutical industry of the Republic of Belarus for 2016–2020, the events of which the creation of generic and innovative drugs for the treatment of diseases with the highest mortality. In this regard, the pharmaceutical industry of the Republic of Belarus significantly expands the range of products, which determines the need to create safe working conditions for workers. The purpose of research-experimentally in acute experiments to determine the parameters of toxicometry to establish the hazard class and further hygienic regulation of the pharmaceutical substance cyclophosphamide. In acute experiments on different types of laboratory animals, the average lethal doses at intragastric and intraperitoneal administration, the average lethal concentration, the threshold and the zone of acute action of the pharmaceutical substance cyclophosphamide were established. It is founded that cyclophosphamide belongs to extremely dangerous substances according to GOST 12.1.007-76 “Harmful substances. Classification and General safety requirements” and extremely toxic substances under tap 125-2008 (02040) “Good laboratory practice”. In order to ensure safe hygienic working conditions for workers in the production of cyclophosphamide, taking into account the experimentally identified features of its acute biological action, the organization of the technological process should ensure the impossibility of getting into the air of the working area of the pharmaceutical substance to exclude contact with the respiratory organs of workers.

Key word: Cyclophosphamide, cytostatics, toxicology, acute toxicity parameters, hygienic regulation, hazard class.

В течение последних лет фармацевтическая отрасль Республики Беларусь динамично развивается. В рамках реализации Государственной программы развития фармацевтической промышленности Республики Беларусь на 2016–2020 гг. предполагается освоить выпуск новых высокоэффективных лекарственных средств для лечения заболеваний, имеющих наиболее высокую летальность (сердечно-сосудистая и онкологическая патология). Внедрение в производство новых лекарственных средств требует создания безопасных рабочих мест, что обеспечивается соблюдением содержания в воздухе рабочей зоны вредных веществ не превышающих их предельно допустимые концентрации и соблюдением требований техники безопасности. Следовательно, для веществ, используемых в производственном цикле на предприятиях, должны разрабатываться гигиенические нормативы (ориентировочные безопасные уровни воздействия или предельно допустимые концентрации). На этапе первичной токсикологической оценки проводится установление параметров острой токсичности для определения класса опасности и токсичности вредных химических веществ для последующей разработки гигиенических нормативов [2, 7].

Одним из высокоэффективных лекарственных средств, применяемых для лечения онкологических заболеваний является циклофосфамид, в связи с чем возникла необходимость проведения токсикологических исследований данной фармацевтической суб-

станции, являющейся основой для производства отечественного препарата.

Циклофосфамид – цитостатик алкилирующего типа действия, который обладает широким спектром противоопухолевой активности и выраженным иммуносупрессивным действием с преимущественным угнетением активности В-субпопуляций лимфоцитов. Противоопухолевое действие реализуется непосредственно в клетках злокачественной опухоли, где циклофосфамид биотрансформируется под действием фосфатаз с образованием активного метаболита, обладающего алкилирующим действием. Активные метаболиты циклофосфамида алкилируют ДНК и белки в клетках, при этом алкильные сшивки ДНК располагаются в местах, труднодоступных для воздействия репаративных механизмов клетки, что приводит к невозможности ее размножения и к апоптозу или гибели клетки.

Циклофосфамид применяется для лечения различных форм лейкозов, злокачественных лимфом, больших злокачественных опухолей с метастазами и без и прогрессирующих аутоиммунных заболеваний [3].

По данным Международного агентства по изучению рака циклофосфамид сам является сильным канцерогеном (категория 1 – канцерогенный для человека), что может способствовать возникновению отдаленных последствий у работающих на фармацевтических предприятиях по производству лекарственных средств из данной фармацевтической субстанции [10].

Циклофосфамид выпускается в виде порошка для приготовления раствора для внутримышечного и внутривенного введения. При анализе технологического процесса изготовления лекарственного средства установлено, что исходное сырье в виде фармацевтической субстанции поступает на складские помещения, а далее на производственный участок, где происходит процесс измельчения субстанции до нужного размера частиц, с последующим просеиванием и дозированием полученного порошка в стеклянные флаконы, которые подвергаются стерилизации и поступают на упаковку.

Установлено, что во время доставки исходного сырья из складских помещений в производственные и во время проведения операций, связанных с дроблением, измельчением и просеиванием фармацевтической субстанции, возможно загрязнение воздуха рабочей зоны циклофосфамидом. Несовершенство технологии производства из-за прерывистости технологического процесса и недостаточной автоматизации производственных операций, а также использование недостаточно герметичного оборудования может приводить к поступлению циклофосфамида в воздух рабочей зоны и создавать опасность для здоровья работающих [4].

Цель исследований – экспериментальным путем в острых опытах определить параметры токсикометрии для установления класса опасности и дальнейшего гигиенического нормирования фармацевтической субстанции циклофосфамид.

Для достижения поставленной цели требуется решение следующих задач:

- установить среднесмертельные дозы при однократном пероральном и внутрибрюшинном введении фармацевтической субстанции циклофосфамид;
- определить среднесмертельную концентрацию при однократном ингаляционном поступлении циклофосфамида;
- установить порог и зону острого действия препарата;
- на основе полученных параметров токсикометрии определить класс опасности и класс токсичности фармацевтической субстанции циклофосфамид.

Материалы и методы. Токсиколого-гигиеническое изучение фармацевтической субстанции циклофосфамид 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» [2, 7]. Токсикологические эксперименты проводились на лабораторных животных (нелинейные самки и самцы белых крыс, исходная масса 180–220 г; нелинейные самки и самцы белых беспородных мышей, исходная масса 18–22 г) с соблюдением принципов биоэтики.

Острое отравление моделировали при введении водного раствора циклофосфамида лабораторным животным с последующим наблюдением в течение 14 суток и регистрацией симптомов клинической картины отравления.

Для оценки острой внутрижелудочной токсичности опытным группам животных вводили однократно *per os* с помощью иглы-зонда водный раствор циклофосфамида, контрольной группе животных в аналогичных условиях вводилась дистиллированная вода. Белым крысам циклофосфамид вводился в дозах 50, 100, 150, 200 и 300 мг/кг (было сформировано 5 опытных групп животных); белым мышам в дозах 175, 250, 300, 500, 700 и 1000 мг/кг (6 групп опытных животных).

Для оценки острой внутрибрюшинной токсичности животным опытных групп вводили однократно с помощью стерильных одноразовых шприцев водный раствор циклофосфамида, животным контрольной группы в аналогичных условиях вводили дистиллированную воду. Дозы введения для белых крыс составили 20, 40, 60, 100, 200 и 300 мг/кг (6 опытных групп животных), а для мышей – 400, 500, 700, 850 и 1000 мг/кг (5 опытных групп животных).

Оценку видовой резистентности животных к токсическому действию циклофосфамида проводили путем расчета коэффициента видовой чувствительности (далее – КВЧ), представляющего собой показатель соотношения среднесмертельных доз более устойчивого вида животных к менее резистентному. Интерпретацию результатов исследования видовой чувствительности проводили на основании предложенных И. В. Саночким и И. П. Улановой (1975) критериев [6].

Для оценки острой ингаляционной токсичности изучали однократное поступление методом интраназального введения водного раствора циклофосфамида с помощью одноразовых пипеток белым крысам в концентрациях 355,8, 609, 705,1 и 800 мг/м³ (4 опытные группы животных). Контрольной группе в аналогичных условиях вводили дистиллированную воду.

Основным критерием токсического действия для определения среднесмертельных доз (DL_{50}) и среднесмертельной концентрации (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).

Для установления порога острого действия изучали биологические эффекты при ингаляционном воздействии циклофосфамида на белых крыс в концентрациях 50, 100 и 250 мг/м³ (3 опытные группы животных). При этом анализировались поведенческие реакции белых крыс в тесте «открытое поле» и признаки угнетения или возбуждения нервной системы по суммационно-пороговому показателю [6, 8].

Результаты и обсуждения. У большинства животных опытных групп симптомы интоксикации в виде угнетенного дыхания и адинамии при однократном внутривенном введении циклофосфамида регистрировались в дозах от 150 до 300 мг/кг для крыс и от 500 до 1000 мг/кг для мышей; при внутрибрюшинном введении в дозах от 100 до 300 мг/кг и от 850 до 1000 мг/кг соответственно и появлялись в течение 5–7 суток, часть животных погибала уже через 48 часов после поступления фармацевтической субстанции. Внешние признаки интоксикации у выживших экспериментальных животных исчезали на 13–14 сутки после введения. Макроскопический патологоанатомический осмотр животных, умерщвленных по окончании 14 суток наблюдения, не выявил каких-либо существенных различий в сравнении с контролем. Результаты определения острой токсичности циклофосфамида представлены в таблице.

В результате эксперимента установлено, что циклофосфамид по величине среднесмертельной дозы при введении в желудок относится к третьему классу опасности (умеренно опасные вещества) как для белых крыс так и для белых мышей ($DL_{50} = 14 \pm 24,8$ мг/кг и $DL_{50} = 704,7 \pm 82,1$ мг/кг соответственно) по ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» [1]. Изучаемая субстанция по этому же показателю в соответствии с ТКП 125-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика» относится к третьему классу токсичности (умеренно токсично) для белых крыс и четвертому классу токсичности (малотоксично) для белых мышей [5].

При внутрибрюшинном введении среднесмертельная доза циклофосфамида составила $173,6 \pm 32,4$ мг/кг для белых крыс и $902,5 \pm 85,1$ мг/кг для белых мышей, что позволяет отнести данную фармацевтическую субстанцию к четвертому классу токсичности (малотоксичные вещества) для белых крыс и пятому классу токсичности (практически нетоксично) для белых мышей по ТКП 125-2008 [5]. Данные по острой внутривенной и внутрибрюшинной токсичности сопоставимы с доступными литературными данными о параметрах острой токсикометрии циклофосфамида [9].

При этом в острых опытах обнаружена выраженная видовая резистентность, о чем свидетельствуют КВЧ при внутривенном и внутрибрюшинном введении (3,3 и 5,2 соответственно). Таким образом, белые крысы являются более чувствительным видом лабораторных животных по сравнению с белыми мышами, что

продиктовало необходимость проведения дальнейших токсикологических исследований на белых крысах.

Клиническая картина острого ингаляционного отравления циклофосфамидом во всех исследуемых концентрациях (диапазон от 355,8 до 800 мг/м³) проявлялась в общей заторможенности и гиподинамии животных опытных групп. На фоне развития бокового положения тела и отсутствия реакции на прикосновение гибель животных регистрировалась на 8–9 сутки после ингаляционного поступления препарата. Внешние признаки интоксикации у выживших животных исчезали на 11–12 сутки после воздействия фармацевтической субстанции. Макроскопический патологоанатомический осмотр животных, умерщвленных по окончании 14 суток наблюдения, выявил геморрагические пятна на легких.

Статистическая обработка результатов эксперимента позволила установить среднесмертельную концентрацию циклофосфамида, которая составила $591,3 \pm 63,5$ мг/м³, что позволяет отнести изучаемую фармацевтическую субстанцию ко второму классу опасности (высокоопасные вещества) по ГОСТ 12.1.007-76 и первому классу токсичности (чрезвычайно токсично) по ТКП 125-2008 [1, 5].

При установлении порога острого действия статистически значимых отличий между животными всех опытных групп по сравнению с контрольной в тесте «открытое поле» не выявлено. Следовательно, по данному показателю не представляется возможным установить порог острого действия циклофосфамида. Со стороны нервной системы по значению суммационно-порогового показателя при воздействии концентрации 50 мг/м³ функциональные изменения опытной и контрольной группы животных отсутствовали. При увеличении концентрации до 100 мг/м³ появилось снижение суммационно-порогового показателя, что говорит о признаках возбуждения нервной системы экспериментальных животных, однако отличие опытной и контрольной группы животных не было статистически значимым. При воздействии концентрации 250 мг/м³ уменьшение суммационно-порогового показателя опытной группы животных по сравнению с контролем оказалось статистически значимым, что свидетельствует о преобладании процессов возбуждения в нервной системе животных, подвергнутых однократному ингаляционному воздействию изучаемой фармакологической субстанции. Следовательно, в качестве порога острого действия принята концентрация 250 мг/м³ по суммационно-пороговому показателю. При этом зона острого действия составляет 2,37, что позволяет отне-

Таблица. Среднесмертельные дозы циклофосфамида при различных путях поступления в организм лабораторных животных

Способ введения	Вид животных	DL_{50} , мг/кг	КВЧ	Класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76	Класс токсичности по ТКП 125-2008
Внутривенно	Белые крысы	$214 \pm 24,8$	3,3	3	3
	Белые мыши	$704,7 \pm 82,1$		3	4
Внутрибрюшинно	Белые крысы	$173,6 \pm 32,4$	5,2	–	4
	Белые мыши	$902,5 \pm 85,1$		–	5

□ Оригинальные научные публикации

сти циклофосфамид к чрезвычайно опасным веществам (первый класс опасности) по ГОСТ 12.1.007-76 [1]. При анализе доступных источников литературы данные об острой ингаляционной токсичности циклофосфамида отсутствовали, что подтверждает научную новизну проведенных исследований.

Таким образом, на основании проведенных токсикологических исследований установлено, что циклофосфамид, представитель цитостатических лекарственных средств алкилирующего типа действия, предназначенный для лечения различных онкологических и аутоиммунных заболеваний, по параметрам острой токсичности относится к чрезвычайно опасным и чрезвычайно токсичным веществам. С целью обеспечения безопасных в гигиеническом отношении условий труда работающих на производстве циклофосфамида с учетом экспериментально выявленных особенностей его острого биологического действия организация технологического процесса и конструкция производственного оборудования должны обеспечить невозможность поступления на всех этапах производства в воздух рабочей зоны фармацевтической субстанции для исключения контакта с органами дыхания работающих. Это может быть достигнуто путем организации непрерывного технологического процесса производства лекарственного средства за счет автоматизации транспортировки сырья и полуфабрикатов; обеспечения герметичности технологического оборудования при процессах измельчения, просеивания, транспортировки; обеспечения эффективной работы аспирационных устройств и применения отсосов закрытого типа; использования рабочими средств индивидуальной защиты органов дыхания.

Литература

1. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. ГОСТ 12.1.007-76. – Введ. 1977-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1976. – 8 с.
2. Гигиеническое нормирование лекарственных средств в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест и воде водных объектов : инструкция 1.1.11-12-206-2003 // Сборник санитарных правил и норм по коммунальной гигиене / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. – Минск, 2005. – Ч. 2. – С. 13–63.
3. Машковский, М. Д. Препараты, применяемые для лечения онкологических заболеваний / М. Д. Машковский // Лекарственные средства. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М., 2012. – Гл. 13. – С. 971–972.
4. Меньшутина, М. В. Характеристика основных видов твердых лекарственных форм / М. В. Меньшутина, Ю. В. Мишина, С. В. Алвес // Инновационные технологии и оборудования фармацевтического производства. – М., 2012. – Т. 1, гл. 3. – С. 41–75.
5. Надлежащая лабораторная практика: ТКП 125-2008 (02040). – Введ. 2008-05-01 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. – Минск: Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении, 2008. – 34 с.
6. Санюцкий, И. В. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений / И. В. Санюцкий, И. П. Уланова. – М.: Медицина, 1975. – 328 с.
7. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ: инструкция 1.1.11-12-35-2004 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. – Минск, 2004. – 43 с.
8. Hall, C. S. Emotional behavior in the rat. I., Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality // J. Comp. Psychol. – 1934. – Vol. 18. – P. 385–403.
9. Lewis, R. J. Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials / R. J. Lewis. – 9th ed. – NewYork, NY: VanNostrandReinhold, 1996. – Vol. 1–3. – P. 972.
10. Pharmaceuticals // IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Год? – Vol. 100A. – P. 63–91.