

# О ВОЗМОЖНОСТИ РАЗВИТИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПРИ КОНТАКТЕ С ПРОИЗВОДНЫМ N-НИТРОЗОАЛКИЛМОЧЕВИНЫ – ЛИЗОМУСТИНОМ

К.И. Стосман,  
Л.В. Луковникова,  
Г.И. Сидорин, Л.И. Дьякова,  
Э.П. Зацепин, Г.В. Шестова,  
Б.С. Литвинцев

ФГБУН «Институт токсикологии  
Федерального медико-биологического  
агентства», 192019, г. Санкт-  
Петербург, Российская Федерация

**В** работе представлены результаты исследования возможности развития токсических эффектов при контакте с противоопухолевым препаратом лизомустин для оценки риска здоровью при изготовлении готовой лекарственной формы и при ее применении. Работа выполнена на 40 беспородных крысах, 40 морских свинках и 114 беспородных мышках. Проведенное экспериментальное исследование показало, что лизомустин не раздражает неповрежденную кожу, не является потенциальным аллергеном, не оказывает кожно-резорбтивного действия, не вызывает нарушений репродуктивной функции. У лекарственного средства выявлены мутагенные свойства, присущие многим цитостатикам, представителям класса нитрозоалкилмочевин. Результаты исследований позволяют сделать заключение о недопустимости наличия препарата в воздухе производственных помещений и на кожных покровах, работающих при его изготовлении и применении готовой лекарственной формы.

**Ключевые слова:** лизомустин, мутагенные свойства, репродуктивная функция, кожно-резорбтивное действие, аллергизирующие свойства.

Цит: К.И. Стосман, Л.В. Луковникова, Г.И. Сидорин, Л.И. Дьякова, Э.П. Зацепин, Г.В. Шестова, Б.С. Литвинцев.

О возможности развития токсических эффектов при контакте с производным n-нитрозоалкилмочевины – лизомустином. Токсикологический вестник. 2020; 3:4. 34-38

**Введение.** Вопросы охраны здоровья работающего населения в любом государстве являются одной из приоритетных проблем сохранения здоровья нации. Для профилактики профессиональных интоксикаций на предприятиях фармацевтической промышленности, а также у медицинского персонала клиник, проводится тщательное изучение токсического действия веществ, потенциальных лекарственных препаратов [1, 2].

Производные N-нитрозоалкилмочевины в настоящее время успешно применяются в составе схем комбинированной химиотерапии при ле-

чении различных видов и локализации злокачественных опухолей. Препараты этой группы обладают не только специфически направленным терапевтическим действием, но и широким спектром побочных токсических эффектов. Попадая в окружающую среду на разных этапах производства и использования, эти вещества в той или иной степени могут оказывать вредное воздействие на человека. Контакт с химиопрепаратами возможен при ингаляционном поступлении при синтезе и приготовлении лекарственных форм, при попадании на кожу, при соприкосновении с упаковочными поверхностями

**Стосман Кира Иосифовна (Stosman Kira Iosiphovna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, kira.stosman@influenza.spb.ru;

**Луковникова Любовь Владимировна (Lukovnikova Lubov Vladimirovna)**, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, lukovnikova.l.v@toxicology.ru;

**Сидорин Геннадий Иванович (Sidorin Gennadij Ivanovich)**, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, sidorin.g@mail.ru;

**Дьякова Людмила Ивановна (Dyakova Lyudmila Ivanovna)**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»;

**Зацепин Эдуард Павлович (Zatsepin Eduard Pavlovich)**, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»;

**Шестова Галина Владимировна (Shestova Galina Vladimirovna)**, доктор медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»;

**Литвинцев Богдан Сергеевич (Litvintsev Bogdan Sergeevich)**, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

ми, загрязненными флаконами, при проведении инъекций и др. Не исключено и пероральное поступление в случае нарушений личной гигиены. Всем этим факторам могут быть подвергнуты работники фармацевтических компаний, имеющие непосредственный контакт с противоопухолевыми препаратами при их производстве, а также медицинский персонал.

Лекарственные средства группы N-нитрозоалкилмочевины обладают канцерогенными, мутагенными, тератогенными, эмбриотоксическими свойствами, могут оказывать аллергизирующее действие [3]. Эпидемиологические наблюдения за состоянием здоровья лиц, занятых в технологическом процессе производства противоопухолевых цитостатиков по разным причинам практически отсутствуют. В последние годы появилась информация о вредном воздействии противоопухолевых препаратов на медицинский персонал онкологических клиник [4, 5, 6]. По данным некоторых авторов, в моче у лиц, занятых приготовлением лекарственных форм цитостатиков, высока вероятность содержания мутагенных субстанций (в виде молекул препаратов или их метаболитов), что можно расценивать как биомаркеры экспозиции и показатели высокой степени риска здоровью [7].

Влияние на репродуктивную функцию – один из аспектов, которому уделяется существенное внимание применительно к характеристике вредных последствий профессионального контакта с химиопрепаратами. Репродуктивная система – наиболее уязвима при действии многих противоопухолевых средств. Проведенные в США исследования, показали, что у медицинского персонала, работающего с противоопухолевыми препаратами, отмечена высокая частота преждевременных родов и более низкий вес ребенка при рождении [8]. В ряде статей описано двукратное повышение риска выкидышей у медсестер, профессионально контактирующих с противоопухолевыми средствами в первом триместре беременности [9, 10]. Исследования с участием медицинского персонала, работающего с цитостатиками, позволяет предположить возможность проявления мутагенного и канцерогенного действия препаратов [11].

В связи с этим, для эффективного наблюдения за состоянием здоровья работающих на производстве, медперсонала онкологических клиник необходимы знания о характере проявлений всех сторон токсического действия противоопухолевых препаратов.

Лизомустин является оригинальным противоопухолевым лекарственным средством, относящимся к соединениям алкилирующего действия, который является бифункциональным хлорэтильным производным нитрозоалкилмо-

чевины, представляет собой смесь 2 изомеров (активного и малоактивного), ингибирует синтез ДНК, РНК и протеинов.

*Целью данной работы* было изучение токсических свойств противоопухолевого препарата лизомустин для оценки возможного риска здоровью персонала при синтезе готовой лекарственной формы и при ее применении.

**Материалы и методы исследования.** Работа выполнена на 40 беспородных крысах с массой тела 160-190 г., 40 морских свинок с массой тела 250-300 г. и 114 мышах с массой тела 18-20 г., полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАН (Ленинградская область). Экспериментальное исследование проведено в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными [12]. Мутагенные, аллергизирующие свойства, оценку репродуктивной функции, раздражающего и кожно-резорбтивного действия осуществляли, используя современные методы исследования [13, 14]. Лизомустин вводили мышам и крысам в брюшную полость. Этот путь введения объясняется тем, что параметры токсичности при введении в брюшную полость близки к параметрам токсичности при поступлении через легкие [15]. Ингаляционный путь поступления лекарственного средства в организм человека наиболее вероятен при его синтезе на производстве и применении в медицинской практике. Раздражающее и кожно-резорбтивное действие исследовали путем однократной аппликации 25% мази лизомустина на вазелиновой основе на 2/3 хвоста мышей с экспозицией 2 часа. Действие препарата на кожу оценивали визуально сразу после воздействия и далее ежедневно в течение 14 дней. Оценка раздражающего действия на слизистые оболочки проводилась при однократном внесении в конъюнктивальный мешок глаза крыс лизомустина в вазелиновом масле (1:3) с последующей регистрацией видимых и скрытых повреждений роговицы в течение 3 суток. Скрытые повреждения роговицы выявляли с помощью 1% раствора флюоресцеина в 2% растворе  $\text{NaHCO}_3$ . Аллергизирующие свойства препарата изучали в реакции гиперчувствительности замедленного типа на мышах, а также методом накожных аппликаций и в тесте конъюнктивальная проба на морских свинок. Для накожных аппликаций лизомустин наносили в течение 28 дней по 5 раз в неделю на выстриженный участок кожи 2x2 см в виде 25% мази на вазелиновой основе. При проведении конъюнктивальной пробы морских свинок сенсibilizировали в течение 30 дней, препарат вводили в дозе 0,1 мг/кг. Для оценки мутагенного действия использовали микроядерный тест *in vivo*. Препарат вводили мышам

однократно в дозах 100 мг/кг и 200 мг/кг. Через 30 часов выделяли костный мозг из бедренной кости, центрифугировали. Из осадка готовили мазки клеток, высушивали и окрашивали по Романовскому–Гимзе–Май–Грюнвальду. Подсчитывали число полихроматофильных (ПХЭ) и нормохромных (НХЭ) эритроцитов с микроядрами. Репродуктивную функцию исследовали на беспородных крысах-самках. Препарат вводили в дозе 0,026 мг/на животное (эквивалентной ингалируемой концентрации 1,0 мг/м<sup>3</sup>, расчетной величине ОБУВ - ориентировочный безопасный уровень воздействия) в течение 30 дней до спаривания. На 20-й день беременности проводили эвтаназию животных. После вскрытия определяли количество желтых тел беременности, плацент и плодов, рассчитывали до-, постимплантационную и общую внутриутробную гибель, измеряли и взвешивали плоды и плаценты, рассчитывали индекс фертильности. В динамике эксперимента (на 7, 14 и 20 дни) оценивали массу тела беременных самок.

Статистическая обработка данных была выполнена с использованием пакета статистических программ «GraphPadPrism 6.0» (США). Отличия между выборками оценили с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и считались значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** В экспериментах на мышах и крысах было показано, что лизомустин не раздражает кожу и слизистые, не проникает через неповрежденные кожные покровы. Однократная аппликация 25% мази на кожу мышей не приводила к каким-либо изменениям. Внесение препарата в конъюнктивальный мешок глаза также не вызывало визуальных изменений слизистых и роговицы.

При изучении алергизирующих свойств пре-

парата у мышей не было выявлено развития гиперчувствительности замедленного типа. Величина отека лапы и индекс реакции у животных из опытных и контрольной групп не различались. При проведении накожных аппликаций у морских свинок не были выявлены симптомы, свидетельствующие об алергизации. Многократное нанесение препарата (20 аппликаций) не вызвало патологических изменений кожных покровов в виде отека, покраснения или некроза. Толщина кожной складки у морских свинок из опытных и контрольной групп не различалась на протяжении всего эксперимента. При проведении конъюнктивальной пробы у морских свинок на всех сроках наблюдения (через 15 минут и 24 часа) реакция на введение препарата отсутствовала. Покраснения слезного протока, склеры или конъюнктивы не наблюдалось. Суммируя вышеизложенное можно заключить, что препарат лизомустин не приводил к развитию гиперчувствительности как немедленного, так и замедленного типа.

Для оценки мутагенного действия препарата лизомустин применялся микроядерный тест *in vivo*, который позволяет выявить структурные изменения хромосом (кластогенный эффект). В микроядерном тесте кластогенный эффект оценивается непрямым путем: подсчетом в интерфазе мелких ядер, образовавшихся из ацентрических фрагментов хромосом или целых хромосом. О цитотоксическом действии вещества судили по определению доли полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) от суммы ПХЭ и нормохромных эритроцитов (НХЭ), отражающей состояние эритропоэза. У мышей из опытных групп обоего пола отмечалось существенное увеличение числа полихроматофильных эритроцитов с микроядрами (табл.). Причем на-

Таблица

Результаты исследования мутагенного действия лизомустина на мышах

Экспериментальные группы животных	Доза препарата 100 мг/кг		Доза препарата 200 мг/кг	
	ПХЭ/НХЭ	Содержание ПХЭ с микроядрами [ед./500 ПХЭ]	ПХЭ/НХЭ	Содержание ПХЭ с микроядрами [ед./500 ПХЭ]
Контроль, самцы	0,93±0,08	0,7	1,00±0,06	0,9
Лизомустин, самцы	0,83±0,09	3,5*	0,84±0,05	9,0*
Контроль, самки	1,29±0,14	0,9	0,91±0,13	0,9
Лизомустин, самки	0,83±0,07*	3,4*	0,74±0,09	5,6*

Примечание: \* - статистически значимо по сравнению с контролем,  $p < 0,05$

блюдалась дозовая зависимость. Так, при введении препарата в большей дозе отмечено почти 2-3-х кратное повышение образования микроядер в цитоплазме клеток.

Выявленные мутагенные свойства являются одним из важнейших механизмов токсического действия лизомустина и указывают на возможность канцерогенного риска, присущего многим цитостатикам представителям класса нитрозоалкилмочевин. Следует подчеркнуть, что отмечалось значимое увеличение процентного соотношения ПХЭ/НХЭ у самок, получавших лизомустин, по сравнению с контролем. Этот факт свидетельствует о том, что у женских особей наблюдался более выраженный генотоксический эффект, что требует дальнейшего исследования. Таким образом, лизомустин, как и большинство противоопухолевых препаратов из группы нитрозоалкилмочевин, обладает мутагенным эффектом. Данный факт дает возможность предположить, что при длительном контакте с препаратом даже в низких дозах риск развития отдаленных последствий, в том числе канцерогенного, вполне вероятен.

В условиях выполненного эксперимента при исследовании возможных токсических эффектов при введении лизомустина на репродуктивную функцию самок крыс показано отсутствие негативного влияния препарата на фертильность животных. Масса тела у особей, получавших лекарственное средство, была несколько снижена, но находилась в пределах физиологической нормы. К окончанию (к 20-му дню) беременности этот показатель у самок обеих экспериментальных групп не имел существен-

ных различий между собой. Результаты эксперимента показали, что поступление лизомустина на уровне расчетной величины ОБУВ<sub>р.з.</sub> (1,0 мг/м<sup>3</sup>) не оказывало влияния на репродуктивную функцию. Выявленное отсутствие негативного эффекта у самок крыс позволяет предположить, что у женщин, имеющих контакт с данным противоопухолевым препаратом до наступления беременности, сохраняется возможность рождения ребенка. Однако необходимо учитывать, что у матери при профессиональной экспозиции цитостатиком повышен относительный риск врожденных пороков развития у детей [16, 17].

**Заключение.** Анализ полученных результатов позволяет заключить, что лизомустин является высокоактивным лекарственным средством с высокой потенциальной возможностью проявления не только мутагенного, но и канцерогенного эффектов (1-2А группы в соответствии с классификацией МАИР) [18]. По данным проведенного экспериментального исследования лизомустин не раздражает неповрежденную кожу, не оказывает аллергизирующего действия. При моделировании условий близких к производственным, при введении дозы лизомустина (0,026 мг/на особь), адекватной поступлению препарата ингаляционным путем на уровне расчетного ОБУВ<sub>р.з.</sub>, нарушений репродуктивной функции не установлено. С целью сохранения здоровья персонала при изготовлении и применении готовой лекарственной формы лизомустина в воздухе рабочей зоны и на кожных покровах работающих наличие препарата не допустимо.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горохова Л.Г., Мартынова Н.А., Кизиченко Н.В., Логунова Т.Д. Гигиенические аспекты состояния здоровья работающих в химико-фармацевтическом производстве. Медицина в Кузбассе. 2017; 16(3): 11-16
2. Иманкулова Б.Н., Джузупов К.О. Влияние химического фактора производственной среды на здоровье медицинского персонала в онкологической клинике. Вестник КГМА им. И.К.Ахунбаева. 2016; 5: 85 - 91.
3. Багирова В.Л., Рышкова Н.Е., Оборотова Н.А. Новая лекарственная форма противоопухолевого препарата Бис-хлорэтил-нитрозомочевины (БХНМ). Ведомости НЦ ЭГКПС. 1999;1: 15-19.
4. Маргаева М.П., Карпова Е.В. Факторы, влияющие на состояние здоровья среди медицинских работников. Медсестра. 2015; 6: 48-58.
5. Rumphal R., Bains T., Goulet G., and Vaillancourt R. Occupational exposure to chemotherapy of pharmacy personnel at a single centre. CJHP. 2015; 68 (2): 104 - 112.
6. Connor T.H., DeBord D.G., Pretty J.R. et al. Evaluation of antineoplastic drug exposure of health care workers at three university-based US cancer centers. J. Occup. Environ Med. 2010;52:1019-1027.
7. Alavi N.M. Occupational Hazards in Nursing. Nurs Midwifery Stud. 2014; 3 (3): 223-257.
8. Тюляндин С.А., Самойленко И.В., Измерова Н.И., Кузьмина Л.П., Королева Е.П., Тихонова Г.И. Руководство для медицинского персонала по безопасному обращению с противоопухолевыми препаратами. Москва; 2012.
9. Walton A.M.L., Mason S., Busshart M., Spruill A.D. et al. Safe Handling: Implementing Hazardous Drug Precautions. Clin J Oncol Nurs. 2012; 16 (3): 251-254.
10. Janes A., Tanguay C., Caron J., Bussieres J-F. Environmental contamination with cyclophosphamide, ifosfamide, and methotrexate: a study of 51 canadian centres. Can J Hosp Pharm. 2015; 68 (4): 279-89.
11. Соленова Л.Г., Якубовская М.Г. Химиотерапия: возможные риски при обращении с противоопухолевыми препаратами. Успехи молекулярной онкологии. 2017; 4 (3): 10-20.
12. Директива 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2012.
13. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012.
14. Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы. Методические указания. МУ 1.1.578-96; 2014.
15. Саночкин И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия). М.: Медицина; 1970.
16. Тихонова Г.И., Рубцова Н.Б., Яковлева Т.П. Условия труда родителей как фактор риска развития врожденных пороков у детей. Безопасность жизнедеятельности 2006;(2):52-7.
17. Shirangi A., Bower C., Holman C.D. et al. A study of handling cytotoxic drugs and risk of birth defects in offspring of female veterinarians. Int J Environ Res Public Health 2014;11(6):6216-30.
18. Agents classified by the IARC MONOGRAPHS, 1-117. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>

## REFERENCES:

1. Gorohova L.G., Martynova N.A., Kizichenko N.V., Logunova T.D. Hygienic aspects of the health status of workers in the chemical and pharmaceutical industry. Medicine in Kuzbass. 2017; 16(3): 11-16 (in Russian).
2. Imankulova B.N., Dzhusupov K.O. The influence of the chemical factor of the working environment on the health of medical personnel in an oncology clinic. Bulletin of I.K. Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy. 2016; 5: 85 - 91 (in Russian).
3. Bagirova B.L., Ryshkova N.E., Oborotova N.A. A new dosage form of the antitumor drug bis-chloroethyl-nitrosourea.

- Vedomosti NC EGKPS. 1999;1: 15-19 (in Russian).
4. *Margaeva M.P., Karpova E.V.* Factors affecting the health status of medical workers. *Nurse*. 2015; 6: 48-58 (in Russian).
5. *Ramphal R., Bains T., Goulet G., Vaillancourt R.* Occupational exposure to chemotherapy of pharmacy personnel at a single centre. *CJHP*. 2015; 68 (2): 104 - 112.
6. *Connor T.H., DeBord D.G., Pretty J.R.* et al. Evaluation of antineoplastic drug exposure of health care workers at three university-based US cancer centers. *J. Occup. Environ Med.* 2010; 52: 1019-1027.
7. *Alavi N.M.* Occupational Hazards in Nursing. *Nurs Midwifery Stud.* 2014; 3 (3): 223-257.
8. *Tyulyandin S.A., Samoilenko I.V., Izmerova N.I., Kuz'mina L.P., Koroleva E.P., Tihonova G.I.* Guidelines for medical personnel on the safe handling of anticancer drugs. Moscow; 2012 (in Russian).
9. *Walton A.M.L., Mason S., Busshart M., Spruill A.D.* et al. Safe Handling: Implementing Hazardous Drug Precautions. *Clin J Oncol Nurs*. 2012; 16 (3): 251-254.
10. *Janes A., Tanguay C., Caron J., Bussieres J-F.* Environmental contamination with cyclophosphamide, ifosfamide, and methotrexate: a study of 51 canadian centres. *Can J Hosp Pharm*. 2015; 68 (4): 279-89.
11. *Solenova L.G., Yakubovskaya M.G.* Chemotherapy: possible risks during handling anticancer drugs. *Advances in molecular oncology*. 2017; 4 (3): 10-20 (in Russian).
12. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union for the protection of animals used for scientific purposes. SPb.;2012.
13. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part 1. M.: Grif & K; 2012 (in Russian).
14. Requirements for the formulation of experimental studies to substantiate the maximum permissible concentrations of industrial chemical allergens in the air of the working zone and atmosphere. Methodological guidelines. MU 1.1.578-96; 2014 (in Russian).
15. *Sanockij I.V.* Methods for determining the toxicity and hazard of chemicals (toxicometry). M.: Medicina; 1970 (in Russian).
16. *Tikhonova G.I., Rubtsova N.B., Yakovleva T.P.* Working conditions of parents as a risk factor for the development of congenital malformations in children. *Life Safety*. 2006;(2):52-7 (in Russian).
17. *Shirangi A., Bower C., Holman C.D.* et al. A study of handling cytotoxic drugs and risk of birth defects in offspring of female veterinarians. *Int J Environ Res Public Health*. 2014; 11(6): 6216-30.
18. Agents classified by the IARC MONOGRAPHS, 1-117. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification>.

*K.I. Stosman, L.V. Lukovnikova, G.I. Sidorin, L.I. Dyakova, E.P. Zatsepin, G.V. Shestova, B.S. Litvintsev*

### ABOUT THE POSSIBILITY OF TOXIC EFFECTS DEVELOPING IN CONTACT WITH N-NITROALKYLUREA DERIVATIVE - LYSOMUSTINE

Institute of Toxicology of the Federal Medical Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

The paper presents the results of a study on the possibility of toxic effects developing in contact with the antitumor drug – lysomustine - to assess the health risk in the manufacture of the finished dosage form and its use. The work was performed on 40 outbred rats, 40 guinea pigs and 114 outbred mice. The experimental study has showed that lysomustine does not irritate intact skin, is not a potential allergen, has no skin-resorptive effect, does not cause reproductive disorders. The drug reveals mutagenic properties inherent in many cytostatics, representatives of the class of N-nitrosoalkylureas. The research results allow to conclude that the presence of the drug in the air of industrial premises and on the skin of workers in its manufacture and use of the finished dosage form is unacceptable.

**Keywords:** *lysomustine, mutagenic properties, reproductive function, skin-resorptive action, allergic properties.*

Quote: K.I. Stosman, L.V. Lukovnikova, G.I. Sidorin, L.I. Dyakova, E.P. Zatsepin, G.V. Shestova, B.S. Litvintsev. About the possibility of toxic effects developing in contact with N-nitrosoalkylurea derivative – lysomustine. *Toxicological Review*. 2020; 4:34-38

Материал поступил в редакцию 13.04.2020 г.

