

Karmustyna – właściwości farmakologiczne i zastosowania w chemioterapii onkologicznej u psów

Jacek Lewicki

z Zakładu Farmakologii i Toksykologii Katedry Nauk Przedklinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Karmustyna (bis-chloroethyl-nitroso-urea – BCNU) jest nitrozozwiązkiem o silnych właściwościach przeciwnowotworowych i jest klasyfikowana jako lek alkilujący (tab. 1). Karmustyna, w odróżnieniu od najczęściej stosowanych tzw. klasycznych leków alkilujących (pochodnych iperytu azotowego), takich jak np. cyklofosfamid, chlorambucil lub melfalan, charakteryzuje się niewielką masą cząsteczkową oraz bardzo wysoką lipofilnością, co umożliwia jej łatwe przenikanie przez barierę krew–mózg. Dzięki takim właściwościom karmustyna już w połowie lat siedemdziesiątych XX wieku była stosowana w USA, m.in. w chemioterapii uzupełniającej nowotworów mózgu u ludzi (1, 2). Obecnie jest stosowana u ludzi również w wielu innych nowotworach (np. w szpiczaku mnogim, ziarnicy złośliwej, chłoniakach niezłośliwych, czerniaku, raku jelita grubego), najczęściej jako składnik programów chemioterapii wielolekowej. Okazało się bowiem, że jedną z bardzo istotnych właściwości pochodnych nitrozomocznika jest także sporadycznie występująca oporność krzyżowa z innymi lekami alkilującymi, zwłaszcza pochodnymi iperytu azotowego (3, 4).

Karmustyna jest lekiem bardzo rzadko stosowanym w onkologii weterynaryjnej. Najlepiej udokumentowane są opisy jej stosowania w przebiegu mięsaka limfatycznego u psów (5, 6). Pojedyncze opisy stosowania BCNU u psów odnoszą się do przypadków czerniaka jamy ustnej oraz gwiaździaka mózgu (7, 8). Równie nieliczne są opisy stosowania karmustyny u psów, dotyczące np. efektywności terapeutycznej/toksyczności, pochodzące z badań przedklinicznych, poprzedzających jej wprowadzenie do chemioterapii onkologicznej u ludzi (9). W latach dziewięćdziesiątych XX wieku przeprowadzono na psach z użyciem BCNU zaledwie kilka doświadczeń o charakterze toksykologicznym, których zasadniczym celem było udoskonalenie schematów chemioterapii u ludzi (10, 11, 12). Biorąc pod uwagę fakt, że radioterapia, która jest podstawową metodą leczenia nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, nie jest powszechnie dostępna

w medycynie weterynaryjnej, autor opracowania uznał za celowe przedstawienie podstawowych informacji na temat właściwości farmakologicznych karmustyny oraz możliwości jej wykorzystania w chemioterapii uzupełniającej (np. po zabiegu chirurgicznym) lub paliatywnej u psów z rozpoznanymi guzami ośrodkowego układu nerwowego. Ponadto w artykule zostaną przedstawione informacje dotyczące stosowania karmustyny w chemioterapii ratującej (rescue chemotherapy), wykonywanej przy wznowie nowotworu, np. w przebiegu mięsaka limfatycznego.

Budowa i właściwości fizyko-chemiczne

Karmustyna (1,3-bis(2-chloroetylo)-1-nitrozomocznik; IUPAC: 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitroso-urea; NSC-409962; CAS No 154-93-8; $C_5H_9N_3Cl_2O_2$; ryc. 1) jest pochodną nitrozomocznika o stosunkowo małej masie cząsteczkowej – 214,049 g/mol. Karmustyna jest żółtawym proszkiem, bardzo słabo rozpuszczalnym w wodzie (4 mg/ml przy 25°C); doskonale natomiast rozpuszcza się w etanolu (13). Wodne roztwory karmustyny charakteryzują się stosunkowo małą stabilnością, zwłaszcza przy alkalicznym pH. W buforze fosforanowym o pH 7,4 (37°C) okres półtrwania BCNU wynosi 52 minuty. Po 5 godzinach przebywania w buforze wodorowęglanowym o pH 7,8 tylko 30% początkowej dawki BCNU pozostawało w nim w postaci niezmienionej (tab. 2).

Mechanizmy działania cytotoksycznego i efekty antynowotworowe

Karmustyna, podobnie jak inne leki alkilujące, charakteryzuje się przede wszystkim zdolnością przyłączania reaktywnych rodników alkilowych do licznych grup funkcyjnych o ujemnym ładunku (tzw. grup nukleofilowych), występujących w cząsteczkach związków biologicznie aktywnych, m.in. DNA, RNA oraz białkach. Przyłączenie rodników alkilowych następuje za pośrednictwem atomów posiadających nadmiar tzw. wolnych elektronów, co prowadzi do wytworzenia wiązań kowalencyjnych.

Carmustine – pharmacological properties and applications in cancer chemotherapy in dogs

Lewicki J. • Division of Pharmacology and Toxicology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agricultural University.

Carmustine (bis-chloroethyl-nitrosourea, BCNU) is a highly lipid-soluble, low molecular weight anticancer compound in the nitrosourea subclass. BCNU undergoes hydrolysis *in vivo* to form reactive metabolites which cause alkylation of biologic molecules and cross-linking of DNA. In humans and animals, intravenously (i.v.) administered carmustine is rapidly degraded and metabolized (denitrosation), with no intact drug detectable after 15 minutes. Carmustine easily crosses the blood-brain barrier, and acts as cell-cycle nonspecific anticancer drug. Bone marrow suppression is the most common dose-limiting toxicity in humans and dogs. Moreover, results of toxicological studies in dogs show that maximum tolerated dose (MTD) for BCNU during 5-days cycle is 45 mg/m² i.v. per day (in cycle 225 mg/m²). In humans, carmustine is commonly used in the treatment of malignant gliomas, multiple myeloma, melanoma, lymphosarcomas, and some forms of gastrointestinal tumors. In dogs, BCNU is used in chemotherapy of brain tumors and malignant lymphosarcoma. The recommended dosage of BCNU in dogs is 50–75 mg/m² i.v. q 4–6 weeks, but there has been no protocol established for the use of carmustine in the treatment of neoplasia in dogs.

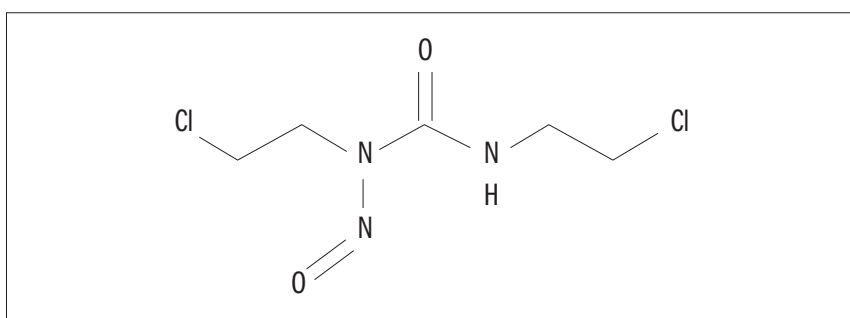
Keywords: carmustine, BCNU, nitrosourea, cancer chemotherapy.

Związki, takie jak karmustyna, posiadające po dwa rodniki alkilowe, charakteryzują się znacznie większą aktywnością antynowotworową niż związki z jednym rodnikiem, np. lomustyna, ponieważ zdolne są do tworzenia krzyżowych wiązań między niciami DNA. W białkach alkilowaniu ulegają najczęściej grupy karboksylowe, imidazolowe, aminowe, sulfhydrylowe oraz hydroksylowe. Alkilacji bardzo łatwo ulegają także zasady purynowe i pirymidynowe (poprzez grupy aminowe), reszty fosforanowe nukleotydów, nukleozydy oraz kwasy nukleinowe, zwłaszcza DNA (ryc. 2). Pochodne nitrozomocznika działają na wszystkie fazy cyklu komórkowego, łącznie z fazą G₀. Należą więc do grupy leków nieswoistych dla cyklu komórkowego (3, 15).

Działania antynowotworowe pochodnych nitrozomocznika zostały szeroko opisane w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX wieku. W badaniach przedklinicznych na zwierzętach laboratoryjnych pierwsze nitrozozwiązki, takie jak: metylo-nitrozoguanidyna lub metylo-

Tabela 1. Klasyfikacja leków alkilujących

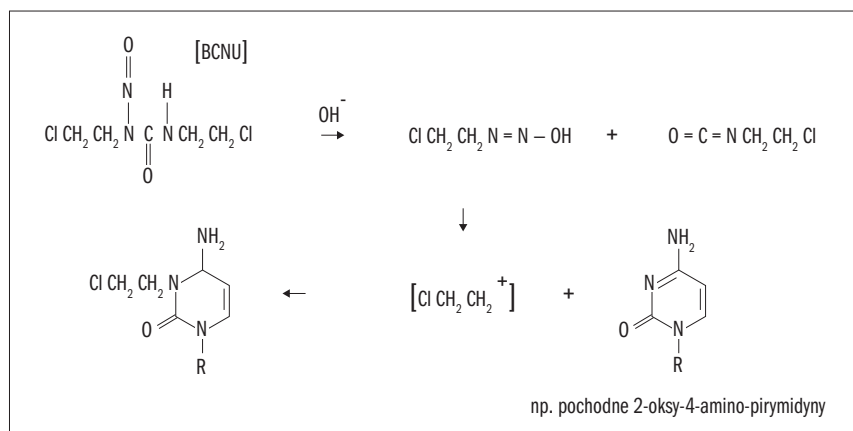
Grupa chemiczna	Przykłady leków
Pochodne iperytu azotowego	cyklofosamid ifosfamid chlormetyna chlorambucil melfalan
Etylenoiminy	tiotepa mitomycyna C
Estry kwasu metanosulfonowego	busulfan
Pochodne nitrozomocznika	karmustyna lomustyna semustyna streptozocyna
Triazeny	dakarbazyna prokarbazyna



Ryc. 1. Budowa chemiczna karmustyny (BCNU)

Tabela 2. Stabilność karmustyny (BCNU) w roztworach wodnych (14)

Rodzaj roztworu	pH	Czas przebywania (godz.)	% BCNU w postaci niezmienionej
0,05 M bufor mrówczanowy	3,5	5	90
0,1 M bufor wodorowęglanowy	7,8	5	30
0,1 M bufor węglanowy	11	0,5 5	20 <3



Ryc. 2. Schemat alkilacji nukleozydu pirymidynowego z udziałem karmustyny (BCNU) – na podstawie pozycji piśmiennictwa (3). W środowisku wodnym karmustyna ulega spontanicznej degradacji (hydrolizie) z wytworzeniem m.in. wodorotlenku chloroetylo-diazonowego ($\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}=\text{N}-\text{OH}$) oraz jonu chloroetylo-karbońowego ($\text{ClCH}_2\text{CH}_2^+$), które mogą alkilować białka, nukleotydy, nukleozydy oraz DNA i RNA, powodując utratę ich właściwości biologicznych. Powstający równocześnie chloroetylo-izocyanian ($\text{O}=\text{C}=\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) wykazuje natomiast specyficzne powinowactwo do grup sulfhydrylowych i aminowych białek, prowadząc m.in. do zahamowania aktywności polimerazy DNA oraz enzymów regulujących syntezę RNA

nitrozomocznik charakteryzowały się jedynie umiarkowaną aktywnością antynowotworową (16). W kolejnych doświadczeniach z użyciem karmustyny stwierdzono jednak znacznie silniejsze działanie antynowotworowe, np. w przebiegu wszczepiennej białaczki myszy L1210. Ponadto w licznych doświadczeniach *in vitro* oraz *in vivo*, z użyciem myszy, szczurów i chomików, wykazano, że karmustyna charakteryzuje się istotnym działaniem antynowotworowym w przebiegu różnych białaczek, chłoniaków, raków, czerniaków oraz wielu innych nowotworów, np. guzów ośrodkowego układu nerwowego (17).

W przeprowadzonych na początku lat siedemdziesiątych doświadczeniach *in vivo* z użyciem eksperymentalnych modeli nowotworów ośrodkowego układu nerwowego (implantowane śródmózgowo glejaki) wykazano, że dootrzewnowa chemioterapia z użyciem BCNU powodowała wydłużenie czasu przeżycia zwierząt laboratoryjnych o 10–137% (myszy) oraz o 38–84% (szczury). Jednocześnie stwierdzono, że karmustyna charakteryzowała się największą aktywnością antynowotworową w porównaniu z innymi chemioterapeutykami, np. cyklofosamidem i metotreksatem (18, 19). Znacznie wyższą aktywność cytostaticzną karmustyny, w porównaniu z innymi chemioterapeutykami (4-hydroperoksy-cyklofosamidem, karboplatiną, cisplatiną oraz bleomycyną) stwierdzono w późniejszych badaniach przeprowadzonych w latach dziewięćdziesiątych (20, 21), a także w najnowszych doświadczeniach sprzed kilku lat (22). W latach dziewięćdziesiątych szczególnie wysoką skuteczność eksperymentalnej chemioterapii glejaków mózgu u zwierząt laboratoryjnych wykazano w serii doświadczeń, w których karmustynę zastosowano w postaci implantów śródmózgowych. U szczurów poddanych chemioterapii, z użyciem implantów zawierających BCNU, średni okres przeżycia zwiększył się o 271% w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Ponadto był on znacznie dłuższy niż u szczurów, które otrzymały karmustynę w postaci bezpośredniej iniekcji do guza nowotworowego (21). W innym doświadczeniu wykazano natomiast, że po śródmózgowym wprowadzeniu implantu zawierającego BCNU okres przeżycia szczurów wzrósł 5,4–7,3-krotnie w stosunku do zwierząt kontrolnych, podczas gdy po dootrzewnowej iniekcji takiej samej dawki BCNU czas przeżycia zwiększył się tylko 2,4-krotnie (23). Ponadto w przeprowadzonych w latach dziewięćdziesiątych badaniach *in vitro* wykazano, że izolowane od psów oraz ludzi komórki glejaka mózgu charakteryzowały się podobną wrażliwością na działanie karmustyny, hipertermii lub promieniowania jonizującego. Największą skuteczność anty-

nowotworową *in vitro* uzyskiwano jednak podczas równoczesnego stosowania karmustyny, hipertermii oraz napromieniania (24). Działanie synergiczne karmustyny w izolowanych od psów komórkach glejaka mózgu obserwowano także podczas łącznego jej stosowania razem ze stymulatorem różnicowania komórkowego – dibutyrylo-cAMP (25).

Farmakokinetyka

Badania farmakokinetyki karmustyny u zwierząt i ludzi przeprowadzono dotychczas w niewielkim zakresie. Podstawową trudność w analizie zmian stężenia karmustyny w płynach biologicznych oraz tkankach stanowi bowiem wysoka reaktywność tego związku oraz gwałtownie przebiegające procesy degradacji/biotransformacji BCNU (26). Karmustyna jest bardzo słabo rozpuszczalna w wodzie. W środowisku wodnym (m.in. w płynach biologicznych) ulega jednak spontanicznej i gwałtownej degradacji (hydrolizie) do związków, które charakteryzują się silnym działaniem antynowotworowym (3). W heparynizowanej krwi szczurów (*in vitro*) tempo eliminacji/degradacji karmustyny było zależne np. od temperatury inkubacji, a okres półtrwania BCNU wynosił: 1413 min (0°C), 61 min (22°C) oraz 12 min – przy 37,5°C (27). Po śródmózgowej iniekcji karmustyny (1 mg do przestrzeni podpajęczynówkowej zatoki mózdkowo-rdzeniowej) u psa o masie ciała 12 kg, stężenia BCNU w płynie mózgowo-rdzeniowym również ulegały gwałtownemu zmniejszeniu, a jej biologiczny okres półtrwania w tym środowisku wynosił tylko 4,2 min (nie stwierdzono obecności karmustyny w płynie mózgowo-rdzeniowym po 30 i 45 min od iniekcji). U psa (12 kg m.c.), który otrzymał śródmózgowo taką samą dawkę karmustyny w postaci liposomów (lipo-BCNU), jej biologiczny okres półtrwania wynosił natomiast 12,1 minuty, przy czym obecności karmustyny w płynie mózgowo-rdzeniowym nie stwierdzano po 45 minutach od iniekcji (28).

Wysokie tempo eliminacji karmustyny obserwowano także w osoczu krwi oraz narządach wewnętrznych zwierząt i ludzi. U myszy, psów, małp i ludzi biologiczny okres półtrwania karmustyny w osoczu krwi wynosił poniżej 5 min (14). U szczurów wartości biologicznego okresu półtrwania karmustyny po jednorazowej iniekcji dożylniej lub podaniu doustnym wynosiły odpowiednio $t_{1/2\beta} = 12\text{--}18$ min oraz $t_{1/2el.} = 29\text{--}35$ min (27, 29). Doświadczenia u małp i ludzi z użyciem znakowanej ^{14}C -karmustyny (^{14}C -BCNU) wykazały jednak, że biologiczny okres półtrwania dla ^{14}C -pozostałości w osoczu krwi wynosi u małp 21–27 godz. (*i.v.* ^{14}C -BCNU) oraz 34 godz. (*p.o.*

Tabela 3. Stężenia ^{14}C -pozostałości w płynie mózgowo-rdzeniowym po dożylnym lub doustnym wprowadzeniu znakowanej ^{14}C -karmustyny u psów (n=2), małp (*Macaca mulatta*; n=2) i ludzi (n=3; 14)

Czas (godz.)	Procent stężenia ^{14}C obserwowanego równocześnie w osoczu krwi						
	pies		małpa – <i>Macaca mulatta</i>		człowiek		
	(10 mg/kg m.c., <i>i.v.</i>)	(10 mg/kg m.c., <i>i.v.</i>)	(10 mg/kg m.c., <i>i.v.</i>)	(10 mg/kg m.c., <i>i.v.</i>)	nr 1 (<i>i.v.</i>)	nr 2 (<i>i.v.</i>)	nr 3 (<i>p.o.</i>)
1 min	-	18	-	-	-	-	-
5 min	126	59	-	-	-	-	-
15 min	73	100	73	-	-	-	-
30 min	69	-	84	-	-	-	-
1	82	90	88	-	97	30	-
1,5	102	97	-	-	-	-	-
2	117	112	85	94	-	-	-
3	130	96	-	-	-	-	-
4	100	139	-	-	-	-	-
6	85	43	-	35	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	30
12	-	-	-	26	-	-	-

^{14}C -BCNU) lub 67 godz. (*i.v.* ^{14}C -BCNU) u ludzi, wskazując jednocześnie, że powodem gwałtownej eliminacji karmustyny z osocza krwi są procesy spontanicznej degradacji lub metabolizmu tego związku (14). W badaniach *in vitro* (izolowane mikrosomy wątroby szczurów) oraz *in vivo* (szczury) przeprowadzonych pod koniec lat siedemdziesiątych XX wieku wykazano, że stymulowana fenobarbitem aktywność enzymów wątrobowych prowadziła do 1,5-krotnego zwiększenia klirensu karmustyny w osoczu krwi oraz 2,5-krotnego zwiększenia tempa jej eliminacji w warunkach *in vitro*; w obu przypadkach jako następstwo nasilenia metabolizmu wątrobowego BCNU. U szczurów, które otrzymywały doustnie fenobarbital stwierdzono równocześnie istotne zmniejszenie działań toksycznych karmustyny oraz całkowite zniesienie jej działania antynowotworowego (30). Badania dotyczące metabolizmu karmustyny przeprowadzone w latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych wykazały, że głównym sposobem biotransformacji wątrobowej tego leku u szczurów jest zależne od aktywności cytochromu P-450 lub transferazy glutationowej – denitrozowanie BCNU (31, 32, 33). W najnowszych badaniach stwierdzono, że eliminacja karmustyny poprzez denitrozowanie (głównie z udziałem transferaz glutationowych) może zachodzić również w innych typach komórek i może być przyczyną lekooporności nowotworów, np. glejaków mózgu (34, 35). Istotne zmniejszenie tempa eliminacji karmustyny obserwowano natomiast u szczurów, które wcześniej otrzymywały

inne leki antynowotworowe. U szczurów kontrolnych wartość biologicznego okresu półtrwania karmustyny po iniekcji dożylniej ($t_{1/2\beta}$) wynosiła 9 min. U szczurów otrzymujących cyklofosamid, cisplatynę lub oba te leki łącznie, wartości $t_{1/2\beta}$ wynosiły natomiast 10–17 min przy czym wzrostowi $t_{1/2\beta}$ dla karmustyny towarzyszyło także 1,5–2-krotne zwiększenie wartości pola pod krzywą (AUC) na wykresie zmian stężenia w osoczu krwi (36).

Karmustyna jest szybko i całkowicie wchłaniana z przewodu pokarmowego, np. u szczurów (27). U myszy po doustnym podaniu znakowanej ^{14}C -karmustyny w ciągu 24 godzin odzyskano w moczu, kale oraz wydychanym powietrzu (jako CO_2) 78–100% dawki ^{14}C , co również świadczy o dużej biodostępności tego związku z przewodu pokarmowego (14). Karmustyna dzięki wysokiej lipofilności szybko przechodzi z krwi do tkanek, dlatego charakteryzuje się dużą objętością dystrybucji (V_d), wynoszącą u szczurów 1,6–2,2 l/kg m.c. (30). U myszy po dootrzewnowej iniekcji ^{14}C -BCNU największe stężenia ^{14}C -pozostałości stwierdzano w wątrobie, jelitach, nerkach, pęcherzu moczowym, płucach oraz mózgu. Podobny stopień dystrybucji BCNU obserwowano także w narządach wewnętrznych u małp (14). U psa, który otrzymał dożylną dawkę ^{14}C -BCNU (10 mg/kg m.c.) wykazano, że po 1 minucie od iniekcji stężenie ^{14}C -pozostałości w płynie mózgowo-rdzeniowym osiągnęło 18% wartości obserwowanej w osoczu krwi (tab. 3). Podobną wartość stężenia ^{14}C -pozostałości BCNU w płynie mózgowo-rdzeniowym

Tabela 4. Maksymalne stężenia karmustyny (BCNU) w tkance mózgowej, płynie mózgowo-rdzeniowym i krwi żyłnej/tętnicznej u psów (37)

Nr psa	Dawka BCNU ¹	Czas infuzji	Maksymalne stężenie BCNU (µg/ml)			
			mózg ²	PM-R ³ /OKT ⁴	OKŻ-ŻSZZ ^{2,5}	OKŻ-ŻUD ⁶
1	10 mg/kg, i.v.	10 min	4,54 (15)	PM-R=0,8 (20)	1,61 (7)	-
2	10 mg/kg, i.v.	5 min	6,21 (6)	-	3,54 (4)	-
3	10 mg/kg, i.a.	30 min	2,42 (47)	PM-R=1,60 (30)	2,22 (30)	1,16 (30)
4	10 mg/kg, i.a.	60 min	5,16 (45)	PM-R=2,67 (45)	1,32 (30)	1,16 (30)
5	10 mg/kg, i.a.	10 min	11,0 (8)	-	10,1 (8)	1,20 (8)
6	10 mg/kg, i.a.	10 min	14,4 (10)	OKT=26,5 (10) ²	3,54 (10)	-

¹ - infuzje roztworów BCNU (15–45 ml) wykonano poprzez katetery umiejscowione w żyłę szyjnej zewnętrznej lub tętnicy szyjnej wewnętrznej; służyły one również do pobierania próbek krwi; ² - stężenie po tej samej stronie ciała w stosunku do żyły/tętnicy, przez którą wstrzykiwano BCNU; ³ - płyn mózgowo-rdzeniowy (PM-R); ⁴ - osocze krwi tętnicznej (OKT); ⁵ - osocze krwi żyłnej - żyła szyjna zewnętrzna (OKŻ-ŻSZZ); ⁶ - osocze krwi żyłnej - żyła udowa (OKŻ-ŻUD); () w nawiasach podano liczbę minut po rozpoczęciu infuzji

Tabela 5. Stężenia karmustyny (BCNU) w tkance mózgowej małp (*Macaca fascicularis*) po śródmózgowym wszczępieniu implantu pCPP: SA¹ zawierającego ³H-BCNU (43)

Odległość od implantu (cm)	Stężenia BCNU w tkance mózgowej (µg/g) w kolejnych dniach po zabiegu chirurgicznym ²					
	dzień 1	dzień 3	dzień 5	dzień 7	dzień 14	dzień 30
<3 mm	749,17	363,88	383,15	111,30	107,02	134,80
1,0–1,3	1,65	-	-	1,07	0,28	0,26
1,3–1,5	0,41	-	-	0,41	0,09	0,06
1,5–2,0	0,36	-	-	0,19	0,02	0,01
2,0–3,0	0,36	-	-	0,03	<0,0008	-
3,0–4,0	0,38	-	-	0,01	<0,0008	0,01
4,0–5,0	0,30	-	-	0,008	<0,0008	0,01

¹ - kopolimer *para*(karboksy-fenoksy)-propanu i kwasu sebacynowego (pCPP: SA) w proporcji 20:80 zawierał 40 mg BCNU (dawka BCNU wynosiła około 8 mg/kg m.c.);

² - w oryginalnej publikacji wyniki podano w µM

oraz osoczu krwi (stan równowagi) obserwowano u tego psa już po 15 minutach od iniekcji. Po 6 godzinach stężenie ¹⁴C-pozostałości w płynie mózgowo-rdzeniowym wynosiło natomiast 43% wartości obserwowanej w osoczu krwi (14).

Największe stężenia karmustyny w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz tkance mózgowej u psów stwierdzano jednak nie po dożylniej iniekcji tego leku, lecz po infuzji dotętnicznej BCNU (tab. 4). U psów nr 5 i 6 po krótkotrwałej (10 minut) dotętnicznej infuzji karmustyny jej stężenia w tkance mózgowej (11,0 i 14,4 µg/ml) osiągnęły połowę wartości stężenia obserwowanego we krwi tętnicznej (26,5 µg/ml), co korespondowało także ze stężeniami karmustyny obserwowanymi po tej samej stronie ciała w układzie żylnym (3,54 i 10,1 µg/ml). Ponadto podczas 10-minutowej infuzji dotętnicznej stężenia BCNU w tkance mózgowej były 2–3-krotnie większe niż podczas infuzji 30/60-minutowej (psy nr 3 i 4; 2,42 i 5,16 µg/ml), przy czym obserwowane w obu przypadkach stężenia BCNU w żyłę udowej były na takim samym, stosunkowo niskim poziomie (1,16 i 1,20 µg/ml), zapew-

nijącym względne bezpieczeństwo dla pozostałych tkanek (37).

Najbardziej zaawansowanym sposobem dostarczenia karmustyny w wysokich stężeniach do tkanki mózgowej, pozwalającym jednocześnie na maksymalne ograniczenie ekspozycji pozostałych tkanek organizmu na działania toksyczne BCNU, jest jej miejscowe wprowadzenie do łoży pooperacyjnej, powstałej w tkance mózgowej po chirurgicznym usunięciu guza nowotworowego (38, 39). Badania dystrybucji karmustyny uwalnianej do tkanki mózgowej z polimeru pCPP: SA przeprowadzono na szczurach, królikach oraz małpach (40). Wykonana u szczurów metodą autoradiografii ilościowej analiza wykazała, że znakowana trytem karmustyna (³H-BCNU) jest powoli uwalniana z implantu do tkanki mózgowej, a jej stężenia w bezpośrednim sąsiedztwie implantu (w okresie 1–30 dni po zabiegu chirurgicznym) wynosiły około 1 mM, tj. 214 µg/g (41). U królików, po 3 dniach od umieszczenia implantu, maksymalnie około 50% obszaru mózgu wykazywało obecność ³H-karmustyny. Stężenia BCNU w tkance mózgowej (w odległości

10 mm od implantu), w okresie 3–7 dni po zabiegu chirurgicznym, wynosiły 6 mM, tj. 1284 µg/g, przy czym 25% dawki trytu obecnego w tkance mózgowej nadal było związane z karmustyną w postaci niezmiennionej (42). U małp, po śródmózgowym wszczępieniu implantu zawierającego ³H-karmustynę, najwyższe stężenia BCNU w tkance mózgowej (3,5 mM = 749,17 µg/g) obserwowano pierwszego dnia po zabiegu chirurgicznym w odległości poniżej 3 mm od powierzchni implantu (tab. 5). W okresie 7–30 dni po zabiegu stężenia karmustyny w bezpośrednim sąsiedztwie implantu nadal były bardzo wysokie i wynosiły 0,50–0,63 mM (107,02–134,80 µg/g; wartość LD₅₀ *in vitro* przy ekspozycji na BCNU trwającej 1 godzinę wynosi dla komórek glejaka około 3,2 µg/ml). W odległości 1,5–5 cm od implantu stężenia BCNU w tkance mózgowej, w ciągu 1–30 dni po zabiegu chirurgicznym, były niskie i nie przekraczały 0,0017 mM, tj. 0,36 µg/g (tab. 5). Obserwowane w tym samym czasie (oprócz 1 dnia po założeniu implantu) stężenia BCNU we krwi oraz płynie mózgowo-rdzeniowym były jednak jeszcze mniejsze – tab. 6 (43).

Tabela 6. Stężenia karmustyny (BCNU) we krwi oraz płynie mózgowo-rdzeniowym (PM-R) małp (*Macaca fascicularis*) po śródmózgowym wszczępieniu implantu pCPP: SA¹ zawierającego ³H-BCNU (43)

Krew/PM-R	Średnie stężenia BCNU (µg/ml) w kolejnych dniach po zabiegu chirurgicznym ²				
	6-24 godz.	dzień 3	dzień 7	dni: 10-14	dni: 21-30
Krew ³	0,71 (1,4)	0,05 (11)	0,07 (28)	0,12 (8,8)	1,07 (23)
	lp=5 n=3	lp=3 n=3	0,04 (16) lp=2 n=2	lp=4 n=2	0,19 (5,7) lp=2 n=1
PM-R ⁴	2,35 (3,0)	0,11 (3,0)	0,05 (16)	0,08 (0,9)	0,62 (21)
	lp=5 n=3	lp=3 n=3	0,05 (20) lp=2 n=2	lp=3 n=2	0,15 (6,6) lp=2 n=1

¹ - kopolimer *para*(karboksy-fenoksy)-propanu i kwasu sebacynowego (pCPP: SA) w proporcji 20:80 zawierał 40 mg BCNU (dawka BCNU wynosiła około 8 mg/kg m.c.);

² - w oryginalnej publikacji wyniki podano w µM; ³ - krew pobierano z żyły udowej; ⁴ - płyn mózgowo-rdzeniowy pobierano, wykonując punkcję lędźwiową lub szyjną;

lp - liczba pomiarów; n - liczba zwierząt; () w nawiasach podano procent radioaktywności odnoszącej się do BCNU w postaci niezmiennionej

Karmustyna, a w zasadzie produkty jej degradacji oraz metabolizmu są powoli eliminowane z organizmu ssaków, głównie drogą wydalania nerkowego. W badaniach z użyciem ¹⁴C-karmustyny ilość wydalonego w ciągu 24 godzin z moczem węglą ¹⁴C wynosiła: 75–82% dawki ¹⁴C-BCNU (myszy), 56–65% (małpy) oraz 34–54% – u ludzi (14). Przeprowadzona u 2 psów (w ciągu 6 godz.) zbiórka moczu wykazała, że ilość wydalonego z moczem ¹⁴C wynosiła 28–30% dożylnej dawki ¹⁴C-BCNU, co było podobne do wartości (25–33%) obserwowanej w takim samym czasie u małp. U myszy niewielkie ilości ¹⁴C wydalane były również z wydychanym powietrzem jako CO₂ (7–10% dawki ¹⁴C-BCNU) oraz kałem (0,6–2,7% dawki ¹⁴C-BCNU) (14). U szczurów, po śródmózgowym wszczępieniu implantu pCPP:SA zawierającego ¹⁴C-BCNU, ilości odzyskanego w ciągu 7 dni węglą ¹⁴C wynosiły: 61,77% dawki ¹⁴C-BCNU (mocz), 4,68% (kał) oraz 4,68% – jako CO₂ (40).

Toksyczność i działania niepożądane

Działania toksyczne leków alkilujących w zasadzie nie mają cech swoistej toksyczności tkankowej lub narządowej. Wyjątkiem od tej reguły jest krwotoczne zapalenie pęcherza moczowego, powodowane przez cyklofosfamid. Charakterystycznymi następstwami działania leków alkilujących u ludzi są przede wszystkim: depresja szpiku kostnego, immunosupresja oraz zaburzenia żołądkowo-jelitowe (nudności, wymioty, biegunka). Ponadto niektóre leki alkilujące działają hepatotoksycznie (cyklofosfamid, busulfan, karmustyna), nefrotoksycznie (ifosfamid, karmustyna), kardiotoxycznie (cyklofosfamid), ośrodkowo neurotoksycznie (ifosfamid, tiotepa), pulmotoksycznie (busulfan, cyklofosfamid, karmustyna) lub powodują inne zaburzenia, takie jak wypadanie włosów, skórne reakcje alergiczne lub niepłodność - cyklofosfamid, ifosfamid (3, 4). Działania

toksyczne pochodnych nitrozomocznika u zwierząt oraz ludzi nie odbiegają w zasadniczy sposób od działań obserwowanych po zastosowaniu innych leków alkilujących. Głównymi zagrożeniami w trakcie leczenia karmustyną u zwierząt laboratoryjnych, a także u psów i u ludzi są: depresja szpiku kostnego oraz zaburzenia żołądkowo-jelitowe. Wyniki wczesnych badań toksykologicznych przeprowadzonych w latach sześćdziesiątych XX wieku wykazały, że maksymalna tolerowana dawka (maximum tolerated dose - MTD) karmustyny u psów w cyklu 5-dniowym wynosi 2,4 mg/kg m.c./dzień, tj. 45 mg/m² p.c./dzień (44).

Depresja szpiku kostnego

Działanie to manifestuje się przede wszystkim zahamowaniem wytwarzania elementów morfotycznych krwi (działanie hematotoksyczne). U ludzi, najczęściej około 3–4 tygodni po zastosowaniu karmustyny, obserwuje się przede wszystkim trombocytopenię (80 000–100 000/µl) oraz leukopenię (4000–5000/µl), które utrzymują się przez 2–3 tygodnie. Trombocytopenia występuje wcześniej niż leukopenia i zwykle ma także bardziej zaawansowany przebieg kliniczny. Obserwowany u ludzi efekt hematotoksyczny karmustyny ma nie tylko charakter opóźniony, ale także jest kumulacyjny i zależny od dawki BCNU (3, 4). Ponadto wykazano, że równoczesne zastosowanie karmustyny z cymetydyną lub teofiliną (inhibitory cytochromu P-450) prowadziło u ludzi do nasilenia objawów depresji szpiku kostnego (2).

U psa z rozpoznaniem gwiązdzakiem mózgu, który otrzymywał karmustynę dożylnie w dawce 50 mg/m² p.c. (co 6 tygodni), nie stwierdzono zaburzeń hematologicznych 5 i 7 dnia po pierwszym cyklu chemioterapii. Przed kolejnym cyklem, tj. po 6 tygodniach, również nie stwierdzono u tego psa istotnych komplikacji hematologicznych, ani biochemicznych.

Badania hematologiczne przeprowadzone po 12 i 18 tygodniach chemioterapii (3 i 4 cykl), tj. 5 i/lub 7 dnia w 1 oraz 2 tygodniu ¼ cyklu, wykazały jednak niewielką neutropenię (1500–2100/µl), przy czym poziom trombocytów we krwi nie odbiegał od normy (7). U 10 zdrowych psów, po jednorazowej, dożylnej infuzji karmustyny w dawce 50 mg/m² p.c., najsilniejszą leukopenię (850–3600/µl) obserwowano jednak w okresie 5–9 dni po infuzji BCNU. Przeciętny okres trwania leukopenii u psów wynosił 8 dni. Po około 10 dniach od infuzji obserwowano u psów także krótkotrwałą i wyraźną trombocytopenię (6000–196 000/µl). Po 20 dniach od infuzji BCNU u żadnego z psów nie obserwowano jednak jakichkolwiek zaburzeń hematologicznych. U psów, w odróżnieniu od ludzi, depresja szpiku kostnego po zastosowaniu karmustyny miała więc ewidentnie ostry charakter. Badania cytologiczne szpiku przeprowadzone po 5 dniach od infuzji BCNU wykazały także zaawansowany zanik wszystkich rodzajów komórek prekursorowych. Badania szpiku przeprowadzone u psów po 8 tygodniach nie wykazały natomiast żadnych nieprawidłowości (45). W innym doświadczeniu u 10 zdrowych psów, które otrzymywały karmustynę w postaci miejscowej iniekcji bezpośrednio do prostaty (2–25 mg BCNU/ml 98–100% etanolu w ilości 50% lub 100% objętości gruczołu; maksymalnie około 200 mg BCNU/m² p.c.), również stwierdzono silną leukopenię w okresie 5–10 dni po iniekcji, wynoszącą maksymalnie nawet poniżej 2000/µl. Od 5 dnia u większości psów obserwowano stały, powolny wzrost liczby leukocytów we krwi, jednak po 15 dniach od iniekcji BCNU liczba leukocytów we krwi wciąż nie powróciła do wartości prawidłowych (12).

Zaburzenia żołądkowo-jelitowe

Niewiele jest danych precyzyjnie opisujących charakter oraz przebieg zaburzeń

żołądkowo-jelitowych u psów po zastosowaniu karmustyny. W opisach badań toksykologicznych pochodzących z lat sześćdziesiątych (dawki BCNU na poziomie MTD), wskazuje się przede wszystkim na częste występowanie zaburzeń żołądkowo-jelitowych o umiarkowanym nasileniu (44). U 11-letniego boston teriera, który w przebiegu gwiąździaka mózgu otrzymał 6 cykli dożylną chemioterapię z użyciem karmustyny (50 mg/m² p.c. co 6 tygodni), nie opisano jednak żadnych komplikacji gastroenterologicznych (7). Podobnie było u zdrowych psów, którym wstrzykiwano pojedynczą dawkę karmustyny dożylnie (50 mg/m² p.c.) lub miejscowo – do gruczołu krokowego (12, 45). U 2 psów z rozpoznaniem czerniakiem jamy ustnej, które otrzymywały karmustynę w postaci iniekcyjnych implantów żelowych, wstrzykiwanych raz w tygodniu przez 4–5 tygodni (dawka kumulacyjna BCNU: 334–360 mg/psa), odnotowano jednak wyraźną, kilkudniową utratę łaknienia oraz depresję ośrodkowego układu nerwowego (8). Anoreksję, wymioty, biegunkę oraz objawy ogólnego odwodnienia stwierdzono również u zdrowego psa, któremu karmustynę (w jednorazowej dawce 4 mg/kg m.c. = 102 mg/m² p.c.) wstrzyknięto do tętnicy szyjnej wewnętrznej (10).

Następstwa iniekcji dotętniczej

Badania z początku lat siedemdziesiątych XX wieku wykazały, że infuzja karmustyny u 4 psów w dawce 2–4 mg/kg m.c. (67–125 mg/m² p.c.) poprzez tętnicę szyjną wspólną (przy jednoczesnym zamknięciu tętnicy szyjnej zewnętrznej) powodowała martwicze zapalenie tętnic mózgowych oraz ślepotę, będącą rezultatem zaburzeń krążenia w obrębie gałki ocznej (9). Przeprowadzone niemal 10 lat później podobne badania, wykonane techniką Seldingera (katetyzacja tętnicy szyjnej wewnętrznej za pośrednictwem kateteru wprowadzonego do tętnicy udowej), nie wykazały toksycznego wpływu karmustyny w obrębie gałki ocznej, potwierdziły jednak indukowanie jednostronnych zmian martwiczych w tętnicach mózgowych oraz wybroczyn w okolicznej tkance mózgowej (krwotoczne zapalenie mózgu). Zmiany te stwierdzono u jednego psa, który otrzymał pojedynczą dawkę karmustyny wynoszącą 102 mg/m² p.c. (n=3) oraz u 3 psów, które otrzymały karmustynę w dawce 215–232 mg/m² p.c. (n=3). U zwierząt, którym wstrzyknięto wyższą dawkę BCNU zmiany histopatologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym były znacznie bardziej nasilone; dodatkowo obserwowano u psów objawy obrzęku półkuli mózgu. W okresie kilku dni po infuzji karmustyny u niemal wszystkich psów wy-

stępowały również objawy osłabienia, odwodnienia i anoreksji (10). Po dotętniczej infuzji karmustyny w dawce 200 mg/m² p.c., kliniczne objawy ośrodkowego działania neurotoksycznego oraz okołonaczyniowe zmiany patologiczne w tkance mózgowej obserwowano także u ludzi (46). Działania neurotoksycznego ani zmian histopatologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym nie stwierdzano jednak u psów po śródmożgowej iniekcji karmustyny (do trzeciej lub bocznej komory mózgu) w dawce 2 lub 5 mg BCNU/tydzień przez 8 tygodni. U jednego psa, który otrzymywał śródmożgowo dawkę 5 mg BCNU/tydzień przez 4 tygodnie stwierdzono objawy zapalenia w obrębie komory mózgu oraz zwężenie wodociągu i obrzęk mózgu (47). Żadnych działań neurotoksycznych lub zmian histopatologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym nie stwierdzono także u psów po dożylną lub dotętniczą infuzji (do tętnicy szyjnej wewnętrznej) karmustyny i azirydynylobenzochinonu (AZQ) lub karmustyny, azirydynylobenzochinonu i cis-platyny (cis-DDP), w dawkach: 1 mg/kg m.c. (10–12 mg/psa BCNU) + 0,5 mg/kg m.c. (AZQ) + 1 mg/kg m.c. (cis-DDP), chociaż obserwowano u nich ciężkie zaburzenia, m.in. hematologiczne oraz gastroenterologiczne (11).

Implant śródmożgowy pCPP:SA

Doświadczenia w zakresie oceny bezpieczeństwa stosowania śródmożgowych implantów zawierających karmustynę przeprowadzono u szczurów, małp i ludzi. U 80 szczurów, które otrzymały karmustynę w postaci pojedynczego implantu pCPP:SA (masa implantu 200 mg), zawierającego 4, 8, 12, 20 lub 32% BCNU, w okresie 200 dni od zabiegu chirurgicznego nie stwierdzono żadnych objawów ośrodkowego działania neurotoksycznego ani zmian histopatologicznych w mózgu, będących następstwem działania karmustyny. Zmian histopatologicznych związanych z działaniem BCNU nie stwierdzono także w sercu, płucach, wątrobie oraz nerkach. U zwierząt, które otrzymały najwyższe dawki karmustyny (20 i 32% BCNU, tj. 40 i 64 mg BCNU/szczura), obserwowano jedynie istotne zmniejszenie przyrostów masy ciała (48). Objawów ośrodkowego działania neurotoksycznego ani związanych z działaniem karmustyny zmian histopatologicznych w mózgu (implant 20% BCNU) nie stwierdzono także u małp (48, 49). Wczesne badania kliniczne z połowy lat dziewięćdziesiątych oraz badania pośmiertne przeprowadzone u ludzi również nie wykazały objawów działania neurotoksycznego ani zmian patologicznych w mózgu wynikających z wpływu karmustyny; maksymalna dawka wynosiła 62 mg BCNU/człowieka (50, 51). Wysokie

bezpieczeństwo śródmożgowych implantów zawierających karmustynę potwierdzają także najnowsze badania kliniczne z użyciem dopuszczanego w 1996 r. (USA) preparatu Gliadel® Wafer. U pacjentów leczonych tym preparatem nie stwierdzono żadnych objawów działania neurotoksycznego, zaburzeń hematologicznych lub komplikacji gastroenterologicznych, będących następstwem stosowania BCNU. Obserwowane u ludzi zaburzenia (m.in. drgawki, wtórne zakażenia rany pooperacyjnej, zakrzepica żył, zatory płucne, ogólne osłabienie oraz zmiany psychiczne) występowały bowiem z taką samą częstością w grupie kontrolnej (52).

Zastosowania terapeutyczne

W światowej literaturze weterynaryjnej z zakresu onkologii istnieje zaledwie kilka opisów klinicznego zastosowania karmustyny u psów. Szczególnie interesujący jest opis chemioterapii przeprowadzonej u 11-letniego boston teriera z rozpoznaniem gwiąździakiem mózgu; u psa występowały napady drgawek, ślepotę oraz inne objawy neurologiczne (7). Badanie tomograficzne mózgu wykazało, że pojedynczy guz (⅔ cm) zlokalizowany jest w prawej półkuli i przylega do bocznej komory mózgu, powodując jej jednostronne powiększenie. Po przeprowadzonej tomografii pies otrzymał dożylnie deksametazon (2 mg/kg m.c.) oraz mannitol (140 mg/kg m.c.) w celu ograniczenia ryzyka obrzęku mózgu. Następnie wykonano dożylną infuzję karmustyny (20 min) w dawce 50 mg/m² p.c. (w kolejnych dniach pies był leczony objawowo z użyciem fenobarbitalu, oksacyliny i prednizonu). Po infuzji BCNU stan kliniczny psa ulegał szybkiej i stałej poprawie. Po 2 tygodniach ustąpiły napady drgawek, a po 6 tygodniach powróciło normalne widzenie. Postanowiono więc kontynuować chemioterapię i kolejne dawki BCNU były stosowane w odstępie 6 tygodni (ostatecznie pies otrzymał 6 cykli chemioterapii). Badanie tomograficzne przeprowadzone po 18 tygodniach wykazało znaczącą (75%) regresję guza nowotworowego. W 29 tygodniu chemioterapii (przed 6 cyklem) wystąpiły jednak kolejne napady drgawek, a w następnym tygodniu obserwowano już objawy zaniku świadomości. Po 6 cyklu chemioterapii (30 tydzień) postanowiono zwiększyć częstotliwość infuzji BCNU. W kolejnych dniach pies przestał jednak jeść i pić, a obserwowane zaburzenia neurologiczne ulegały nasileniu. W 31 tygodniu zdecydowano więc o eutanazji. Przeprowadzone badanie histopatologiczne potwierdziło wstępne rozpoznanie tomograficzne i wykazało obecność glejowych komórek nowotworowych charakterystycznych dla gwiąździaka mózgu (7).

Tabela 7. Charakterystyka pacjentów oraz wyniki leczenia mięsaka limfatycznego z użyciem karmustyny (BCNU), winkrystyny i prednizonu¹ (5)

Lp.	Opis pacjenta, stadium nowotworu wg WHO ²	Tkanki/narządy objęte procesem nowotworowym	Czas leczenia (dni)	Odpowiedź ³	Remisja (dni)	Czas przeżycia (dni)
1.	Pudel miniaturowy ÷, 7 lat, 7 kg m.C., Iva	węzły chłonne, śledziona	270	CR	1133	1140
2.	Sznaucer miniaturowy ×, 7 lat, 9 kg m.C., Va	węzły chłonne, wątroba, śledziona, szpik kostny	310	CR	575	670
3.	Owczarek niemiecki ×, 3 lata, 37 kg m.C., Vb	węzły chłonne, śledziona, szpik kostny	90	CR	33	102
4.	Owczarek niemiecki ⁴ ×, 4 lata, 27 kg m.C., Vb	węzły chłonne, wątroba, śledziona, szpik kostny	235	CR	183	269
5.	Bulmastif ⁴ ÷, 5 lat, 54 kg m.C., Va	węzły chłonne, śledziona, szpik kostny	130	CzR	93	153
6.	Mieszaniec ÷, 3 lata, 8 kg m.C., Va	węzły chłonne, wątroba, śledziona, szpik kostny	208	CR	201	224
7.	Owczarek kanadyjski ×, 3 lata, 34 kg m.C., Vb	węzły chłonne, wątroba, śledziona, szpik kostny	75	CR	40	146

¹ – Schemat chemioterapii: BCNU – *i.v.* 50 mg/m² p.c.; dzień: 1, następnie co 6 tygodni (wykonano 2–7 cykli chemioterapii; dawka kumulacyjna BCNU wynosiła 100–298 mg/m² p.c.); winkrystyna – *i.v.* 0,7 mg/m² p.c.; dni: 1, 8, 13, 20, następnie co 3 tygodnie; prednizon – *p.o.* 40 mg/m² p.c.; dni: 1–7, następnie *p.o.* 20 mg/m² p.c. co 48 godzin; ² – World Health Organization; ³ – CR = całkowita remisja, CzR = częściowa remisja; ⁴ – w okresie chemioterapii podtrzymującej remisję zwiększono dawkę BCNU do 75 mg/m² p.c.

Oprócz opisanego wyżej pojedynczego przypadku chemioterapii guza mózgu u psa oraz krótkiego opisu miejscowego stosowania karmustyny w postaci żelowych implantów u 2 psów z rozpoznaniem czerniakiem jamy ustnej (8), w światowej literaturze weterynaryjnej istnieją jeszcze dwa obszernie opisy stosowania BCNU w chemioterapii mięsaka limfatycznego (5, 6). U 7 psów z zaawansowanym mięsakiem limfatycznym, które nie były wcześniej leczone cytostatykami, zastosowano złożoną chemioterapię z użyciem karmustyny (50–75 mg/m² p.c.), winkrystyny i prednizonu. Po 4 tygodniach chemioterapii indukcyjnej u 6 psów stwierdzono całkowitą remisję nowotworu trwającą 33–1133 dni; u 28,5% psów uzyskano remisję trwającą ponad 1 rok (tab. 7). U części psów obserwowano słabe lub umiarkowane działania niepożądane chemioterapii, takie jak anoreksję, biegunkę, wymioty, wyłysienia lub hiperpigmentację skóry, zwłaszcza w początkowym okresie chemioterapii indukcyjnej. U wszystkich zwierząt (7 dnia chemioterapii) stwierdzono natomiast neutropenię (2100/μl) oraz leukopenię (3830/μl). W czasie całego cyklu chemioterapii u wszystkich psów (przynajmniej raz) obserwowano jednak leukopenię na poziomie poniżej 1000/μl. Podczas chemioterapii podtrzymującej remisję, zwłaszcza w okresie równoczesnego stosowania BCNU oraz winkrystyny, u niektórych psów obserwo-

wano także niewielką trombocytopenię – 157 000–449 000/μl (5).

Wysoką skuteczność złożonej chemioterapii mięsaka limfatycznego, uwzględniającej m.in. dożylną infuzję karmustyny, wykazano także w najnowszych badaniach klinicznych, w których cyklicznej chemioterapii ratującej (cykl 28-dniowy) poddawano psy z objawami nawrotu choroby nowotworowej (6). Wszystkie użyte w tym doświadczeniu zwierzęta były wcześniej poddawane złożonej chemioterapii, głównie z zastosowaniem doksorubicyny (najczęściej 4–8 cykli), po której u znacznej większości pacjentów nastąpiła całkowita remisja nowotworu. Spośród 14 psów, które otrzymały: karmustynę (*i.v.* 50 mg/m² p.c. – dzień: 0), winkrystynę (*i.v.* 0,7 mg/m² p.c. – dzień: 0 i 7), prokarbazynę (*p.o.* 50 mg/m² p.c. – dni: 0–13) oraz prednizon (*p.o.* 30 mg/m² p.c. – dni: 0–13), ponowną całkowitą remisję (130 dni) uzyskano u 4 psów, częściową remisję (140 dni) uzyskano u 3 psów, a stabilizację choroby stwierdzono u 5 pacjentów. U większości zwierząt w czasie chemioterapii obserwowano silną neutropenię (n=9), trombocytopenię (n=7) oraz zaburzenia żołądkowo-jelitowe (n=7). U 2 psów wystąpiły także ciężkie komplikacje związane z działaniem leków cytostatycznych (posocznica i zaburzenia żołądkowo-jelitowe), które doprowadziły do śmierci. U innego psa, który w różnych cyklach tej samej chemioterapii ratującej otrzymywał lo-

mustynę (dawka kumulacyjna 200 mg/m² p.c.) oraz karmustynę (dawka kumulacyjna 95 mg/m² p.c.) przyczyną śmierci było natomiast zwłóknienie płuc (6).

Przygotowanie roztworu karmustyny

Roztwór karmustyny do iniekcji powinien być przygotowany *ex tempore*. Zawartość fiołki (100 mg BCNU) należy rozpuścić w 3 ml dołączonego rozpuszczalnika, którym jest odwodniony alkohol etylowy. Następnie do alkoholowego roztworu BCNU należy dodać 27 ml wody do iniekcji (każdy ml będzie zawierał wtedy 3,33 mg BCNU w 10% roztworze alkoholowym). Tak przygotowany roztwór należy chronić przed światłem. Roztwór ten jest stabilny tylko przez 8 godzin (w temperaturze 25°C) i może być następnie dodawany do 5% roztworu glukozy lub 0,9% roztworu NaCl. Uwaga! Do przygotowania i przechowywania roztworów BCNU nie wolno używać butelek/pojemników z polichloroku winylu (PVC). W tym celu należy używać wyłącznie opakowań ze szkła.

Preparaty handlowe

BiCNU® (Bristol-Myers Squibb) – fiołka: 0,1 (substancja sucha) + fiołka: 3 ml (roztwór rozpuszczalnik).

Uwaga! Fiolki z nierozpuszczoną karmustyną należy przechowywać w lodówce,

w temperaturze 2–8°C. Preparat jest dostępny w Polsce tylko w ramach tzw. importu docelowego. Import docelowy prowadzi: Hurtownia Farmaceutyczna, ul. Logistyki 3, 96-320 Mszczonów, tel. 046 857 3235 (cena orientacyjna brutto za fiolkę 0,1 BiCNU: około 160 zł).

Podsumowanie

Karmustyna jest pochodną nitrozomocznika o silnych właściwościach antynowotworowych. Jest słabo rozpuszczalna w wodzie, doskonale natomiast rozpuszcza się w etanolu. Ponadto wodne roztwory BCNU charakteryzują się małą stabilnością i muszą być przygotowane *ex tempore*. Mechanizm działania cytotoksycznego karmustyny polega na alkilowaniu zasad purynowych i pirymidynowych, reszt fosforanowych nukleotydów, nukleozydów, RNA, DNA oraz białek, co powoduje utratę ich właściwości biologicznych. Pochodne nitrozomocznika działają na wszystkie fazy cyklu komórkowego, łącznie z fazą G₀. Należą więc do grupy leków nieswoistych dla cyklu. Karmustyna charakteryzuje się szerokim spektrum działania antynowotworowego, obejmującym m.in. białaczki, chłoniaki, raki, czerniaki oraz nowotwory ośrodkowego układu nerwowego. Wykazano również, że spośród aktualnie dostępnych w medycynie substancji cytotoksycznych karmustyna charakteryzuje się największą aktywnością przeciwnowotworową w odniesieniu do guzów ośrodkowego układu nerwowego, zwłaszcza przy równoczesnym stosowaniu innych metod leczenia, takich jak radioterapia lub immunoterapia.

Karmustyna jest bardzo szybko eliminowana z osocza krwi w wyniku spontanicznej degradacji (hydroliza) oraz metabolizmu wątrobowego (denitrozowanie), a jej biologiczny okres półtrwania u myszy, psów, małą i ludzi wynosi poniżej 5 minut. Doświadczenia przeprowadzone u małą i ludzi z użyciem znakowanej ¹⁴C-karmustyny wykazały jednak, że biologiczny okres półtrwania dla ¹⁴C-pozostałości BCNU w osoczu krwi wynosi nawet kilkadziesiąt godzin. Po dożylnym lub dotętniczym infuzji karmustyna doskonale przechodzi z krwi do narządów wewnętrznych, płynu mózgowo-rdzeniowego lub tkanki mózgowej, osiągając tam stężenia kilkakrotnie wyższe niż aktualne stężenia w osoczu krwi. Infuzja dotętnicza BCNU u psów w dawce powyżej 100 mg/m² p.c. związana jest jednak z wysokim ryzykiem krwotocznego zapalenia mózgu. Bardzo bezpiecznym sposobem dostarczenia karmustyny w wysokich stężeniach do tkanki mózgowej jest natomiast śródmózgowe wprowadzenie do łoża pooperacyjnej implantu o nazwie Gliadel® Wafer. Wysokie stężenia BCNU w obszarze interwencji chi-

rurgicznej (na poziomie >100 µg/g) osiągnęte są jednak tylko w odległości 3–4 mm od krawędzi implantu, co jest prawdopodobnie główną przyczyną tylko stosunkowo niewielkiego zwiększenia skuteczności terapeutycznej karmustyny podczas zwalczania glejaków mózgu u ludzi (39, 52). Niestety, dotychczas nie przedstawiono żadnych wyników badań farmakologicznych/toksikologicznych ani klinicznych z użyciem tego preparatu u psów.

Działania toksyczne karmustyny u zwierząt oraz ludzi mają podobny charakter i polegają głównie na wywoływaniu zależnych od dawki umiarkowanych lub silnych zaburzeń hematologicznych (leukopenia, neutropenia, trombocytopenia) oraz żółtkowo-jelitowych (anoreksja, nudności, wymioty, biegunka). Nie stwierdzono jednak występowania tego rodzaju zaburzeń u ludzi leczonych karmustyną w postaci śródmózgowego implantu Gliadel® Wafer.

Karmustyna jest cytostatykiem rzadko stosowanym w medycynie weterynaryjnej. Dotychczasowe wyniki wstępnych badań klinicznych u psów wykazały, że niektóre rodzaje nowotworów (zwłaszcza glejak mózgu oraz mięsak limfatyczny) są bardzo podatne na działanie cytotoksyczne karmustyny, a cykliczna chemioterapia pozwala na uzyskanie całkowitej i długotrwałej remisji, wynoszącej u psów niekiedy nawet 1–2 lata. Stosowane w dotychczasowych badaniach klinicznych u psów dożylnie dawki karmustyny (50–75 mg/m² p.c. co 4–6 tygodni) wydają się jednak zbyt niskie, zwłaszcza w kontekście wyników badań toksykologicznych, w których maksymalna tolerowana dawka BCNU u psów w cyklu 5-dniowym wynosiła 45 mg/m² p.c./dzień (w cyklu 225 mg/m² p.c.).

Piśmiennictwo

- Levin V. A., Wilson C. B.: Nitrosourea chemotherapy for primary malignant gliomas. *Cancer Treat. Rep.* 1976, **60**, 719–724.
- Weiss R. B., Issell B. E.: The nitrosoureas: carmustine (BCNU) and lomustine (CCNU). *Cancer Treat. Rev.* 1982, **9**, 313–330.
- Tew K. D., Colvin O. M., Chabner B. A.: Alkylating agents. W *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*, wyd. III, pod red. Chabner B.A., Longo D.L., Lippincott Williams & Wilkins 2001, str. 373–414.
- Colvin O. M., Friedman H. S.: Alkylating agents. W *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, wyd. VII, pod red. DeVita V. T. Jr., Hellman S., Rosenberg S. A., Lippincott Williams & Wilkins 2005, str. 332–344.
- Lucas S. R. R., Pereira Coelho B. M., Marquez M. L., Franchini M. L., Miyashiro S. I., de Benedetto Pozzi D. H.: Carmustine, vincristine, and prednisone in the treatment of canine lymphosarcoma. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 2004, **40**, 292–299.
- LeBlanc A. K., Mauldin G. E., Milner R. J., LaDue T. A., Mauldin G. N., Bartges J. W.: Efficacy and toxicity of BOPP and LOPP chemotherapy for the treatment of relapsed canine lymphoma. *Vet. Comp. Oncol.* 2006, **4**, 21–32.
- Dimski D. S., Cook J. R. Jr.: Carmustine-induced partial remission of an astrocytoma in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 1990, **26**, 179–182.
- Kitchel B. E., Brown D. M., Luck E. E., Woods L. L., Orenberg E. K., Bloch D. A.: Intraleptal implant for treatment of primary oral malignant melanoma in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994, **204**, 229–236.

- DeWys W. D., Fowler E. H.: Report of vasculitis and blindness after intracarotid injection of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU; NSC-409962) in dogs. *Cancer Chemother. Rep.* 1973, **57**, 33–40.
- Omojola M. F., Fox A. J., Auer R. N., Viñuela F. V.: Hemorrhagic encephalitis produced by selective non-occlusive intracarotid BCNU injection in dogs. *J. Neurosurg.* 1982, **57**, 791–796.
- Wright K. C., Stephens L. C., Wallace S., Savaraj N., Feun L. G.: Experimental combination chemotherapy: intracarotid versus intravenous administration of aziridinylbenzoquinone, BCNU, and cisplatin in dogs. *Chemotherapy* 1987, **33**, 437–444.
- Levy D. A., Cromeens D. M., Evans R., Stephens L. C., von Eschenbach A. C., Pisters L. L.: Transrectal ultrasound-guided intraprostatic injection of absolute ethanol with and without carmustine: a feasibility study in the canine model. *Urology* 1999, **53**, 1245–1251.
- Council of Europe: Carmustine. W *European Pharmacopoeia*, wyd. V, tom 2, Council of Europe, Strasbourg Cedex, France 2004, str. 1191.
- DeVita V. T., Denham C., Davidson J. D., Oliverio V. T.: The Physiological disposition of the carcinostatic 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) in man and animals. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1967, **8**, 566–577.
- Bono V. H. Jr.: Review of mechanism of action studies of the nitrosoureas. *Cancer Treat. Rep.* 1976, **60**, 699–702.
- Schepartz S. A.: Early history and development of the nitrosoureas. *Cancer Treat. Rep.* 1976, **60**, 647–649.
- Schabel F. M. Jr.: Nitrosoureas: a review of experimental antitumor activity. *Cancer Treat. Rep.* 1976, **60**, 665–698.
- Shapiro W. R., Ausman J. I., Rall D. P.: Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: evaluation of 1,3-bis(chloroethyl)-1-nitrosourea, cyclophosphamide, mithramycin, and methotrexate. *Cancer Res.* 1970, **30**, 2401–2413.
- Barker M., Hoshino T., Gurcay O., Wilson C. B., Nielsen S. L., Downie R., Eliason J.: Development of an animal brain tumor model and its response to therapy with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Cancer Res.* 1973, **33**, 976–986.
- Kimler B. F., Liu C., Evans R. G., Morantz R. A.: Intracerebral chemotherapy in the 9L rat brain tumor model. *J. Neurooncol.* 1992, **14**, 191–200.
- Buahin K. G., Brem H.: Interstitial chemotherapy of experimental brain tumors: comparison of intratumoral injection versus polymeric controlled release. *J. Neurooncol.* 1995, **26**, 103–110.
- Khil M. S., Kolozsvary A., Apple M., Kim J. H.: Increased tumor cures using combined radiosurgery and BCNU in the treatment of 9L glioma in the rat brain. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2000, **47**, 511–516.
- Tamargo R. J., Myseros J. S., Epstein J. I., Yang M. B., Chasin M., Brem H.: Interstitial chemotherapy of the 9L gliosarcoma: controlled release polymers for drug delivery in the brain. *Cancer Res.* 1993, **53**, 329–333.
- Salcman M., Ebert P. S.: *In vitro* response of human glioblastoma and canine glioma cells to hyperthermia, radiation, and chemotherapy. *Neurosurgery* 1991, **29**, 526–531.
- Ebert P. S., Salcman M.: Differentiation therapy is potentiated by chemotherapy and hyperthermia in human and canine brain tumor cells *in vitro*. *Neurosurgery* 1994, **34**, 657–664.
- Oliverio V. T.: Pharmacology of the nitrosoureas: an overview. *Cancer Treat. Rep.* 1976, **60**, 703–707.
- Russo R. G., Cattaneo M. T., Bartošek I.: Pharmacokinetics of nitrosoureas: comparison of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) and 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) after oral and intravenous administration to rats. *Tumori* 1984, **70**, 499–502.
- Kitamura I., Kochi M., Matsumoto Y., Ueoka R., Kuratsu J., Ushio Y.: Intrathecal chemotherapy with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea encapsulated into hybrid liposomes for meningeal gliomatosis: an experimental study. *Cancer Res.* 1996, **56**, 3986–3992.
- Bartošek I., Russo R. G., Cattaneo M. T.: Pharmacokinetics of nitrosoureas: levels of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) in organs of normal and walker 256/B carcinoma bearing rats after i.v. bolus. *Tumori* 1984, **70**, 491–498.
- Levin V. A., Stearns J., Byrd A., Finn A., Weinkam R. J.: The effect of Phenobarbital pretreatment on the antitumor activity of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU), 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) and 1-(2-chloroethyl)-3-(2,6-dioxo-3-piperidyl)-1-nitrosourea (PCNU), and on the plasma pharmacokinetics and biotransformation of BCNU. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1979, **208**, 1–6.
- Lin H. S., Weinkam R. J.: Metabolism of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea by rat hepatic microsomes. *J. Med. Chem.* 1981, **24**, 761–763.

32. Talcott R. E., Levin V. A.: Glutathione-dependent denitrosation of N,N'-bis(2-chloroethyl)N-nitrosourea (BCNU): nitrite release catalyzed by mouse liver cytosol *in vitro*. *Drug Metab. Dispos.* 1983, **11**, 175–176.
33. Weber G. F., Waxman D. J.: Denitrosation of the anti-cancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea catalyzed by microsomal glutathione S-transferase and cytochrome P450 monooxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, **307**, 369–378.
34. Smith M. T., Evans C. G., Doane-Setzer P., Castro V. M., Tahir M. K., Mannervik B.: Denitrosation of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea by class Mu glutathione transferases and its role in cellular resistance in rat brain tumor cells. *Cancer Res.* 1989, **49**, 2621–2625.
35. Lien S., Larsson A.-K., Mannervik B.: The polymorphic human glutathione transferase T1-1, the most efficient glutathione transferase in the denitrosation and inactivation of the anticancer drug 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochem. Pharmacol.* 2002, **63**, 191–197.
36. Jones R. B., Matthes S., Kemme D., Dufton C., Kernan S.: Cyclophosphamide, cisplatin, and carmustine: pharmacokinetics of carmustine following multiple alkylating-agent interactions. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1994, **35**, 59–63.
37. Hochberg F. H., Poletti C. E., Krull I. S., Strauss J.: Analysis and distribution of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) in biological specimens. *Neurosurgery* 1983, **13**, 230–233.
38. Wang C.-H., Li J., Teo C. S., Lee T.: The delivery of BCNU to brain tumors. *J. Control. Release* 1999, **61**, 21–41.
39. Guerin C., Olivi A., Weingart J. D., Lawson H. C., Brem H.: Recent advances in brain tumor therapy: local intracerebral drug delivery by polymers. *Invest. New Drugs* 2004, **22**, 27–37.
40. Fleming A. B., Saltzman W. M.: Pharmacokinetics of the carmustine implant. *Clin. Pharmacokinet.* 2002, **41**, 403–419.
41. Fung L. K., Shin M., Tyler B., Brem H., Saltzman W. M.: Chemotherapeutic drugs released from polymers: distribution of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in the rat brain. *Pharm. Res.* 1996, **13**, 671–682.
42. Grossman S. A., Reinhard C., Colvin O. M., Chasin M., Brundrett R., Tamargo R. J., Brem H.: The intracerebral distribution of BCNU delivered by surgically implanted biodegradable polymers. *J. Neurosurg.* 1992, **76**, 640–647.
43. Fung L. K., Ewend M. G., Sills A., Sipos E. P., Thompson R., Watts M., Colvin O. M., Brem H., Saltzman W. M.: Pharmacokinetics of interstitial delivery of carmustine, 4-hydroperoxycyclophosphamide, and paclitaxel from a biodegradable polymer implant in the monkey brain. *Cancer Res.* 1998, **58**, 672–684.
44. Freireich E. J., Gehan E. A., Rall D. P., Schmidt L. H., Skipper H.: Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother. Rep.* 1966, **50**, 219–244.
45. Miyashiro S. I., Hagiwara M. K., Brandao L. P., Lucas S. R. R.: Bone marrow toxicity induced by carmustine (BCNU) in dogs. W Proceedings of the 26th World Small Animal Veterinary Association, Vancouver, British Columbia, Canada, 2001.
46. Mahaley M. S., Whaley R. A., Blue M., Bertsch L.: Central neurotoxicity following intracarotid BCNU chemotherapy for malignant gliomas. *J. Neurooncol.* 1986, **3**, 297–314.
47. Levin V. A., Byrd D., Campbell J., Giannini D. D., Borcich J. K., Davis R. L.: Central nervous system toxicity and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intraventricular 3-[[4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)ethyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and other nitrosoureas in Beagles. *Cancer Res.* 1985, **45**, 3803–3809.
48. Sipos E. P., Tyler B., Piantadosi S., Burger P. C., Brem H.: Optimizing interstitial delivery of BCNU from controlled release polymers for the treatment of brain tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1997, **39**, 383–389.
49. Brem H., Tamargo R. J., Olivi A., Pinn M., Weingart J. D., Wharam M., Epstein J. L.: Biodegradable polymers for controlled delivery of chemotherapy with and without radiation therapy in the monkey brain. *J. Neurosurg.* 1994, **80**, 283–290.
50. Brem H., Piantadosi S., Burger P. C., Walker M., Selker R., Vick N. A., Black K., Sisti M., Brem S., Mohr G., Muller P., Morawetz R., Schold S. C.: Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. *Lancet* 1995, **345**, 1008–1012.
51. Brem H., Ewend M. G., Piantadosi S., Greenhoot J., Burger P. C., Sisti M.: The safety of interstitial chemotherapy with BCNU-loaded polymer followed by radiation therapy in the treatment of newly diagnosed malignant gliomas: phase I trial. *J. Neurooncol.* 1995, **26**, 111–123.
52. Lawson H. C., Sampath P., Bohan E., Park M.C., Hussain N., Olivi A., Weingart J., Kleinberg L., Brem H.: Interstitial chemotherapy for malignant gliomas: the Johns Hopkins experience. *J. Neurooncol.* 2007, **83**, 61–70.

Dr J. Lewicki, Zakład Farmakologii i Toksykologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, e-mail: jacek_lewicki@sggw.pl