

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
им. И. К. АХУНБАЕВА**

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Диссертационный совет Д 03.17.558

На правах рукописи
УДК 615.012.8: 616-006 (575.2) (043.3)

КАМЧИБЕКОВА ЧОЛПОН

**РАЗРАБОТКА НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ГЛИКОЗИЛ-
НИТРОЗОМЕТИЛМОЧЕВИНА-1**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Бишкек - 2019

Работа выполнена в Кыргызской Государственной Медицинской академии им. И. К. Ахунбаева и Институте химии и фитотехнологий НАН КР

Научный консультант: Заслуженный деятель науки Кыргызской Республики, член-корр. НАН КР, профессор каф. базисной и клинической фармакологии Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева, доктор медицинских наук, профессор
Зурдинов Аширали Зурдинович

Официальные оппоненты: Назарбаев Университет Республики Казахстан, National laboratory Astana, ведущий научный сотрудник, доктор медицинских наук, профессор
Гуляев Александр Евгеньевич

заведующий кафедрой клинической фармакологии Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова, академик НАН РК, доктор медицинских наук, профессор
Рахимов Кайролла Дюсенбаевич

и.о. профессор кафедры семейной медицины додипломного обучения Кыргызской государственной медицинской академии им. И.К. Ахунбаева, доктор медицинских наук
Давлеталиева Нурила Емелбековна

Ведущая (оппонирующая) организация: ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» МЗ РФ, (420012, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Бутлерова, 49).

Защита диссертации состоится 7 июня 2019 г. в 13.00 часов в конференц-зале на заседании диссертационного совета Д 03.17.558 при в Кыргызской Государственной Медицинской академии им. И.К. Ахунбаева и Институте биотехнологии НАН КР по адресу: г. Бишкек, ул. Ахунбаева, 92. Код доступа к онлайн защите диссертации в ZOOM webinar 8607586340.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызской Государственной Медицинской академии им. И. К. Ахунбаева, 720020, г. Бишкек, ул. Ахунбаева, 92 (<http://kgma.kg>) и библиотеке НАН КР, 720071, г. Бишкек, проспект Чуй, 265.

**Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 03.17.558, к.м.н., доцент**

Сабирава Т.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. В связи с повсеместным ростом онкологической заболеваемости, в мире уделяют пристальное внимание созданию эффективных и безопасных ПО лекарственных средств. Обостренный интерес к данной проблеме объясняется расширением сферы побочных действий известных препаратов. Например, большая часть ПО препаратов проявляют гематотоксичность, иммунотоксичность и нейротоксичность, вызывают изменения в эндокринной системе и т.д.

Современная медицина наряду с достижениями научно-технического прогресса заинтересована в создании новых ПО средств близких к естественным метаболитам организма, поскольку они обладают хорошей растворимостью, малой токсичностью, избирательностью действия. Среди перспективных ПО препаратов значимое место занимают цитостатические средства производные НММ: N-Нитрозо-N-метилмочевина; арабинопиранозил-N-метил-N-нитрозомочевина; этилнитрозомочевина; кармустин, ломустин и др. Препараты данного типа являются алкилирующими агентами и обладают широким спектром ПО действия, часть препаратов входят в признанные международные схемы ХТ. Производные НММ являются высокоэффективными лечебными препаратами и современная ХТ ряда опухолей немыслима без их использования (например, ломустина и кармустина при лимфомах и миеломах). Но достаточно высокая токсичность нитрозомочевины ограничивает спектр показаний и область использования таких препаратов. В связи с этими обстоятельствами поиск новых субстанций с потенциалом ПОА и с приемлемым уровнем токсичности в химической группе производных НММ является актуальным, и интенсивно ведется в последние годы и в мире, и в России, и в Кыргызстане [Кадагидзе З.Г. и др., 2015; Tarhini A.A. et al., 2014; Kyi C. et al., 2014]. Предполагается, что введение углеводных остатков в структуру биологически активных соединений приводит к резкому снижению их токсичности, что позволяет использовать метод гликозилирования соединений как один из возможных путей получения малотоксичных лекарственных средств. На основании этой гипотезы в Институте химии и фитотехнологий Национальной Академии наук Кыргызской Республики в течение ряда лет проводился направленный синтез группы производных НММ и в результате этих работ была получена субстанция гликозил-нитрозометилмочевина-1 (гликозил-НММ-1).

Связь темы диссертации с крупными научными программами, основными научно-исследовательскими работами, проводимыми научными учреждениями. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований, проводимых Кыргызской государственной

медицинской академией им. И.К. Ахунбаева и ИХФ НАН, Министерства образования и науки КР (госрегистрационный № 0005351), в рамках темы «Разработка нового противоопухолевого лекарственного препарата гликозил-нитрозометилмочевина-1».

Целью настоящего исследования является научное обоснование разработки новой цитостатической ПО субстанции со сниженным потенциалом токсичности в группе производных НММ и доклиническое исследование фармакологии и токсикологии оригинальной субстанции гликозил-НММ-1.

Достижение поставленной цели обусловило постановку следующих **задач исследования:**

1. изучить физико-химические свойства субстанции гликозил-НММ-1;
2. исследовать острую и хроническую токсичность гликозил-НММ-1;
3. выявить специфическую ПОА субстанции гликозил-НММ-1;
4. исследовать неспецифические виды токсичности гликозил-НММ-1 (местно-раздражающее действие, аллергогенность, иммунотоксичность, кумулятивные, канцерогенные, мутагенные, эмбриотоксические, тератогенные свойства);
5. изучить фармакокинетические параметры гликозил-НММ-1;
6. определить перспективность разработки нового ПО препарата на основе субстанции гликозил-НММ-1.

Научная новизна полученных результатов

- Впервые изучены физико-химические свойства субстанции гликозил-НММ-1, установлены параметры специфической и неспецифической токсичности, исследована фармакокинетика.
- Впервые среди производных НММ найдена субстанция с минимальным уровнем токсичности.
- Впервые установлено ПО действие гликозил-НММ-1.
- Впервые оригинальная субстанция из группы производных НММ предложена в качестве основы для создания нового ПО препарата.
- Получен Патент КР на изобретение № 1129 от 31.12.2008 г. «Способ лечения АОЭ» с использованием гликозил-НММ-1.

Практическая значимость полученных результатов заключается в том, что результаты исследования могут быть использованы в качестве основы для проведения клинических исследований, и в последующем для создания нового ПО препарата из НММ с низкой токсичностью, расширяющего возможности ПО ХТ.

Экономическая значимость полученных данных определяется тем, что в конечном итоге результаты проведенной нами работы, в дальнейшем станут основанием для использования гликозил-НММ-1 в качестве фармацевтического продукта.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Получена новая субстанция из производных НММ - гликозил-НММ-1, изучен состав, физико-химические свойства субстанции.
2. Изучена острая и хроническая токсичность гликозил-НММ-1.
3. Доказано наличие специфической ПОА субстанции гликозил-НММ-1.
4. Исследованы фармакологические свойства гликозил-НММ-1 (местно-раздражающее, аллергогенное, иммунотоксические, кумулятивные, канцерогенные, мутагенные, эмбриотоксические и тератогенные).
5. Определена фармакокинетика субстанции гликозил-НММ-1.
6. Обосновано создание ПО препарата на основе гликозил-НММ-1.

Личный вклад соискателя. Автором проводилось изучение физико-химических, фармако-токсикологических свойств гликозил-НММ-1, специфической ПОА, фармакокинетики, способа лечения животных с АОЭ, сбор и обработка материала, систематизация полученных результатов, их анализ, обобщение и интерпретация в рамках цели исследования.

Апробация результатов исследования. В диссертации основные положения и результаты работы доложены: на II съезде РНО фармакологов (Москва, 2003); I съезде фармацевтов КР (Бишкек, 2003); международном симпозиуме «Молекулярные механизмы регуляции функции клетки» (Тюмень, 2005); международных конференциях: «Современные проблемы геохимической экологии и сохранения биоразнообразия», «Сохранение и устойчивое использование растительных ресурсов», «Актуальные проблемы сохранения и рационального использования биологических ресурсов – как основы развития фармацевтической промышленности» (Бишкек, 1998, 2002-2004, 2010, 2015); «Проблемы современной микробиологии и биотехнологии» (Ташкент, 1999); республиканских конференциях: «Экология и природные ресурсы Тянь-Шаня» (Ош, 2002), «Экологическая безопасность горной страны и новые информационные технологии в образовании», «Физиология, морфология, патология человека и животных в климато-географических условиях Кыргызстана», «Старт в большую науку» (Бишкек, 2002-2004, 2013).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. Содержание и основные результаты диссертации отражены в 28-и публикациях, в том числе в 1 монографии и 7-и журналах, вошедших в Перечень рецензируемых научных изданий, утвержденных президиумом ВАК КР.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материала и методов исследования, 5-и глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов, списка литературы и приложения, изложена на 297 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 127 рисунками, содержит 9 таблиц. Библиографический указатель состоит из 359 источников, из них - 133 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе «Обзор литературы» приводятся результаты научных исследований о современном состоянии проблемы химиотерапии опухолей (ХТО) в области онкологии, о достижениях и первичных вопросах ХТ опухолевых заболеваний, о перспективах поиска и разработке ПО средств, акцентирующее внимание на изучении и создания новых эффективных и безопасных лекарственных средств. Известно, что основное направление в изыскании средств базировалось на фундаментальных исследованиях Р.Е. Кавецкого, который впервые установил взаимоотношения между растущей опухолью и изменениями в организме. Огромную роль в развитии ХТ, в области изучения опухоли, разработке ПО средств, методов профилактики, диагностики и лечения опухолей сыграли работы известных российских ученых Л.Ф. Ларионов, И.А. Рапопорт, З.П. Софьина и др.

Во многих странах мира проводились изыскания по разработке методов синтеза, изучению физико-химических и ПО свойств соединений, среди них удельный вес имели синтетические средства. При этом, главным образом, обращалось внимание на создание эффективных и безопасных ПО средств.

На наш взгляд, такими безопасными средствами могут стать производные НАМ, которые тормозят синтез ДНК и угнетают активность фермента, преобразующего рибонуклеотид в дезоксирибонуклеотид. Более того, НАМ являются препаратами I ряда, составляя одну из основных, широко используемых ПО средств. Как отмечают ряд исследователей [Эммануэль Н.М. и др., 1973; Блохин Н.Н. и др., 1977; Горбачева Л.Б. и др., 1979] важным свойством НАМ является индукция в структурных повреждениях хромосом, которая длительно существует в растущих опухолевых клетках, а в нормальных, хромосомные aberrации быстро удаляются.

Известно, что многими исследователями разрабатываются современные методы общего воздействия на опухоль, где ПО препараты используются самостоятельно или комбинированно. Одной из популярных комбинаций считается режим МОРР, который даёт аналогичные режимы: VAMP, СОАР, РОМР и др., суть которых состоит в большей эффективности лечения. Например, VAMP эффективна при овариальной карциноме, миелоидном лейкозе, злокачественных герминогенных опухолях яичка [Семиглазов В.Ф., 1998; Давыдов М.И. и др., 2003], что вполне доказывает об эффективности применения производных НАМ.

В пользу применения ПО средств говорят следующие факты: НАМ являются препаратами I линии входят в международные схемы ХТ, широко применяются в моно-, полиХТ и в комбинации с другими ПО препаратами.

Таким образом, современное состояние проблемы ХТО решаются

общими усилиями всех стран мира. Методами лечения рака являются ХТ, хирургическое лечение, ЛТ и др. Значительную роль играют современные методы диагностики, профилактики и лечения общим воздействием на опухоль. В развитии методов лечения злокачественных новообразований (ЗНО) важное значение имеет исследование ХТ средств, с целью создания эффективного и безопасного ПО препарата, в частности, субстанции гликозил-НММ-1, которая основывается на проведении физико-химических, фармако-токсикологических, морфологических и клинических исследований.

Во второй главе описаны «Материал и методы исследования».

Объекты исследования: субстанция гликозил-НММ-1, препарат сравнения – циклофосфамид, экспериментальные животные (2368): 1340 белые беспородные мыши и линии мышей BALBC массой 18-22 г, 888 крысы Вистар (160-200 г), 96 морские свинки (360-420 г) и 44 кролики породы Шиншилла (3-3,5 кг) обоих полов.

Предмет исследования: изучение фармакологических свойств и специфической ПО активности субстанции гликозил-НММ-1.

Физико-химические исследования проведены в соответствии с Государственной Фармакопеей (ГФ) XI (М., 1987, 1990) и XIII изд. (М., 2015). Фармакологические исследования проводились согласно «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», (М., 2012.) и «Временные методические рекомендации ДЛО и МТ. Требования к доклиническому изучению общетоксического действия новых фармакологических веществ», (Б., 2000).

Руководствуясь оценкой характеристик соответствующими положениями ГФ определялись: цвет; подлинность 0,1% раствора субстанции методом спектрофотометрии и УФ спектра; температура плавления методом 1 и 1а; удельное вращение (α) расчетным методом при концентрации 0,01%; удельный показатель поглощения 0,1% раствора методом спектрофотометрии; цветность раствора путем сравнения с эталонными растворами; механические включения (хлориды, сульфаты); рН; посторонние примеси методом тонкослойной хроматографии (ТСХ); содержание воды методом К. Фишера; сульфатная зола; тяжелые металлы; отклонение массы содержимого одного флакона от средней массы; стерильность; количественное содержание субстанции и её компонентов: *ксилозы безводной, метилмочевины, п-аминобензойной кислоты, этанола, кислоты хлористоводородной, натрия нитрита, воды дистиллированной* в одном флаконе. Т.о., при изучении физико-химических свойств гликозил-НММ-1 использовались соответствующие методы определения сухих лекарственных средств, предназначенных для парентерального введения по ГФ XI изд.

Изучение острой токсичности гликозил-НММ-1 проводилось по методу Литчфилда и Уилкоксона, определялась ЛД₅₀ - доза, вызывающая гибель 50 % животных. Результаты опыта оценивались через 24 часа. Учитывалось состояние и процент погибших животных. Наблюдение за животными проводилось в течение 7 суток. По результатам опыта рассчитаны: ЛД₅₀, ЛД₁₆ и ЛД₈₄ [Харкевич Д.А., 1999; Лужников Е.А., 2000]. Для выявления токсического резорбтивного действия гликозил-НММ-1 проводилось морфологическое изучение органов и тканей экспериментальных животных. Погибшие животные вскрывались согласно общепринятым методам, у выживших животных проводился ежедневный контроль массы тела. Наблюдение проводилось в течение 7-и суток, после которого из каждой группы забивалось по 3 животных под эфирным наркозом. У животных для гистологического исследования забирались органы (кожа с подлежащей мышечной тканью, почки, надпочечники, тимус, селезенка, лимфатические узлы, тонкий кишечник, печень, сердце и легкие и др.). Образцы ткани фиксировались в 10% нейтральном формалине, обрабатывались общепринятыми способами. Микроскопия проводилась на МБИ-15-2.

Хроническая токсичность гликозил-НММ-1 исследовалась на 160 белых беспородных мышах и 240 крысах-самцах, которым (мыши и крысы) внутрибрюшинно (в/б) вводилась субстанция в дозах: 1/5, 1/10 и 1/20 от ЛД₅₀ (мыши) (40; 20 и 10 мг/кг) и (крысы) (65; 33 и 16 мг/кг) и циклофосфамид (2, 1 и 0,5 мг/кг) и (3, 2 и 1 мг/кг) по 0,4 мл 1 раз в сутки в течение 1, 2 и 3-х месяцев. Животным контрольной группы вводился изотонический раствор хлорида натрия (0,9 %).

В ходе опыта учитывались следующие показатели: изменение состояния животных, масса тела, ректальная температура, биоэлектрическая активность сердечной мышцы, дыхательная система, анализ крови (эритроциты, лейкоциты, цветной показатель, лейкоцитарная формула, СОЭ; биохимические показатели (белковый, углеводный и липидный) обмена веществ; клеточные элементы костного мозга, изменения со стороны ЦНС: поведенческие реакции, нервно-мышечная возбудимость и др.

Изучение влияния гликозил-НММ-1 на массу тела животных проводилось по общеизвестной методике. Способность оказывать пирогенное действие на организм, изучалось методом измерения базальной температуры, с помощью электротермометра марки ТПЭМ. Влияние на дыхательную и ССС осуществлялось методом записи биоэлектрической активности миокарда крыс на ЭКК-01 во II стандартном отведении [Трахтенберг И.М. и др., 1991] и подсчета дыханий в 1 минуту [Западнюк И.П., 1974]. Анализ периферической крови проводился на гематологическом анализаторе, подсчитывалось количественное содержание гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов,

лейкоцитарная формула и СОЭ. Действие на клеточные элементы костного мозга: лимфоциты, моноциты, плазматические клетки, ретикулоциты, мегакариоциты, незрелые клетки миелоидного ряда, элементы эритропоэза, гемопоэза, созревание эритробластов, костно-мозговой индекс нейтрофилов и лейко-эритробластическое соотношение изучалось по общеизвестной методике [Камышникова В.С., 2011]. Изучение влияния на обмен веществ (белковый, углеводный, жировой), биохимических показателей сыворотки крови: общий белок, белковые фракции, креатинин, мочевины, остаточный азот, общие липиды, β -липопротеиды, холестерин, сахар крови проводилось по общеизвестным методам [Меньшикова В.В. и др., 2003]. Активность неспецифических оксидаз печени оценивалось по продолжительности гексеналового сна [Plea et al., 1958]. Функциональное состояние мочевыводящей системы оценивалось по величине диуреза и анализу мочи [Предтеченский В.Е., 1960]. Для оценки ориентировочно-исследовательских реакций и состояния рефлексов ЦНС у животных применялась методика «открытого поля» [Андронати С.А. и др., 1982], регистрировалось число горизонтальных, вертикальных перемещений, грумингов, дефекаций; изменение рефлексов ЦНС [Раевский К.С., 1976; Крапивин С.В. и др., 1991].

С целью исключения токсического действия и в дополнение к изучению хронической токсичности проводилось морфологическое изучение внутренних органов животных после введения гликозил-НММ-1 в течение 1, 2 и 3-х месяцев. В конце опыта и из каждой группы забивалось по 3 животных под эфирным наркозом методом декапитации и подвергались аутопсии для морфологического исследования. Учитывался процент погибших животных. У всех групп животных для гистологического исследования забиралась органы (кожа с подлежащей мышечной тканью, головной, костный мозг, сердце, легкие, печень, поджелудочная железа, желудок, тонкий и толстый кишечника, почки, надпочечники, щитовидная железа, семенники, тимус, селезенка и др.), которые фиксировались в 10 % формалине, жидкости Карнуа и 96% спирте. Микротомировались на санном микротоме. Гистологическая обработка материалов осуществлялась по общепринятым методикам [Науат М.А., 1993]. Микроскопия тканевых структур проводилась по общеизвестным методам, разработанным для каждого органа на светооптическом микроскопе МБИ-15-2 [Автандилов Г.Г., 1990; Sainte-Marie G. et al., 1996; Cooper G.M., 1997].

Изучение специфической ПОА гликозил-НММ-1 проводилось на линейных мышах BALBС с АОЭ согласно «Методические рекомендации по доклиническому изучению специфической активности фармакологических веществ», (М., 2005) и «Методические рекомендации по доклиническому изучению специфической активности фармакологических веществ», (М., 2005). Нами проводилось морфологическое исследование ПОА гликозил-НММ-1 на асцитном и подкожном (п/к) вариантах АОЭ животных-опухоленосителей.

Исследование фармако-токсикологических свойств гликозил-НММ-1, состояния органов проводилось согласно «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», (М., 2012). Местно-раздражающее действие субстанции изучалось в двух сериях опыта на 60 морских свинках. Возможное аллергическое действие изучалось на морских свинках и крысах. Кумулятивные свойства изучались по методу Lim [Медведь Л.И. и др., 1990]. Для оценки состояния иммунной системы использовались методы I и II уровней исследования в микроварианте. Методом спонтанного розеткообразования (Е-РОК) с эритроцитами кролика определялось содержание Т-лимфоцитов [Петров Р.В. и др., 1992; Хаитов Р.М. и др., 1995; Cunningham A. J. et al., 1974]. Содержание Т-лимфоцитов определялось с помощью эритроцитов, нагруженных антителами и комплементом (ЕАС-РОК). Изучение гуморальной иммунной системы проводилось по методу АОК (В-лимфоциты) по Каннингему и Jerne (1974). Числа АОК, первичные и вторичные иммунные реакции определялись по методу Каннингема и Шенберга (1968), по Морозову В.Л. и др. (1989). Изучение канцерогенных свойств субстанции проводилось согласно «Методическое письмо по исследованию бластомогенных свойств различных веществ в опытах на животных», (М., 2012). Изучение мутагенной активности гликозил-НММ-1 проводился микроядерным тестом на культуре клеток L5178Y соответственно руководства OECD по испытаниям химических веществ № 487, 2016; J. Oliver et al., 2006. Эмбриотоксические и тератогенные свойства проводились в соответствии с «Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и их влияния на репродуктивную функцию», (М., 2012). Изучение фармакокинетических параметров гликозил-НММ-1 в крови у крыс проводилось в сопоставлении со временем циркуляции в кровотоке в сравнении с фармакокинетическими характеристиками гликозил-НММ-1, собственно НМ [Димитриев Д.А., 1997; M. Yamamoto et al., 1996; Dierick K. et al., 2009].

Способ лечения АОЭ (диплоидный вариант) с гликозил-НММ-1 проводился на опухоленосителях согласно «Методические рекомендации по первичному отбору ПО препаратов», (М., 1980).

Статистическая обработка результатов исследований проводилась по методу программы «Стат-6» Excel с использованием критериев Фишера и Стьюдента при $P \leq 0,95$ (М., 2012).

В III главе «Состав, способ получения и физико-химические свойства субстанции гликозил-НММ-1» приводится состав, технология получения и результаты изучения физико-химических свойств гликозил-НММ-1 в соответствии с ГФ XI и XIII изд.

При решении данных задач исследований нами приводилась оценка гликозил-НММ-1 с характеристикой составных частей: *ксилоза безводная* – 15г,

метилмочевина - 8,3 г, парааминобензойная кислота - 0,4 г, этанол – 60 мл, кислота хлористоводородная - 0,4 мл, натрия нитрит – 3 г, вода дистиллированная - 4,8 мл и кислота уксусная ледяная - 25 мл. Технология получения гликозил-НММ-1 состоит: из реакции взаимодействия моносахаридов с алкилмочевинами в условиях нуклеофильного катализа с добавлением ариламинов и нитрозирования N-алкил-гликозилмочевин.

Субстанция представляет собой сухую лиофилизированную пористую массу белого цвета с желтоватым оттенком; подлинность – в области от 240 до 290 нм, максимум поглощения составляет $253 \pm 2,11$ нм; температура плавления - 114° - 116° С; удельное вращение 0,01 % раствора в воде $[\alpha]_{20D} = -22,4^{\circ}$ ($C_D=1$; H_2O); показатель поглощения ($E_{1\%}^{1cm}$) 0,1 % раствора не более 0,237 при 240 нм; цветность раствора выдерживает сравнение с эталонным раствором № 7 б; рН – 4-6; выдерживает требования на механические включения для сухих лекарственных субстанций для инъекций (И 68-175-99); на ТСХ появлялось пятно серого цвета ($R_f = 0,59$); хлориды не более 0,02 %, сульфаты - 0,05%, содержание воды – 10 %, сульфатная зола - 0,1 %, тяжелые металлы - 0,0001 %; масса содержимого 1 флакона - $0,185 \text{ г} \pm 15 \%$; стерильна (ГФ Х1 изд.); содержание гликозил-НММ-1 в одном флаконе и её компонентов в 1 г от 0,169-0,210 г. Проводилась метрологическая характеристика количественного определения. Хранение проводилось в сухом, защищенном от света месте, при температуре (-10° С). Срок годности определялся после изучения 5-и серий субстанции через каждые полгода, хранившегося в течение 2 года 3 месяца. Т.о., гликозил-НММ-1 в составе содержит компоненты, которые широко используются в фармацевтической практике. Субстанцию получают методом синтеза, которая хорошо растворима в воде, обладает избирательными свойствами характерными для моносахаридов. Гликозил-НММ-1 по нормативам соответствует требованиям ГФ для сухих лекарственных субстанций, предназначенных для инъекций.

В IV главе «Изучение токсикологических свойств гликозил-НММ-1 в сравнении с циклофосфамидом» приводятся данные по острой токсичности субстанции гликозил-НММ-1 в 4-х сериях опытов на 120 белых беспородных мышах-самцах и крысах массой соответственно 22-25 г и 180-200 г обоих полов. В двух сериях опыта субстанция вводилась однократно в/б и в/в (в/в) в дозах: (1800, 1900, 2100, 2200 и 2400 мг/кг и 600, 700, 800, 900 и 1000 мг/кг), и циклофосфамид (80; 90, 110; 120; 140 мг/кг и 70; 90; 110; 130; 150 мг/кг) по 1 мл на 1 мышь и крысу. Контрольным животным вводился раствор хлорида натрия (0,9 %). Оценка результатов опыта проводилась через 24 ч. По методу Литчфилда и Уилкоксона определялась LD_{50} , LD_{16} и LD_{84} .

I серия эксперимента проведена на 30 мышах. Было сформировано 5 групп. Каждая доза изучалась на 6 мышах. После в/б введения гликозил-

НММ-1 в дозах: 1800 и 1900 мг/кг клиническая картина проявлялась в кратковременном беспокойстве, умеренной бледности мордочек, ушей, передних и задних конечностей, хвоста. Животные были активными, принимали корм и обычно реагировали на внешние раздражители.

При повышении дозы до 2100 мг/кг интенсивность вышеуказанных признаков увеличивалась, держалась длительно, животные становились пассивными. При увеличении дозы до 2200 мг/кг на фоне общей бледности, акроцианоза наблюдалось вялость, влажность шерстного покрова, учащение дыхания, адинамия. Количество погибших животных - 5. В дозе 2400 мг/кг в течение 2,5-3 часов животные погибали в клинической картине острой интоксикации (табл. 1).

Таблица 1 – Острая токсичность субстанции гликозил-НММ-1 на белых беспородных мышах при внутрибрюшинном введении

№ пп	Показатели	Доза соединения, мг/кг				
		1800	1900	2100	2200	2400
1	<i>Наблюдающийся эффект</i>	0/6	2/6	4/6	5/6	6/6
2	в пробитах	3,76	4,20	5,43	5,97	6,20
3	в процентах	29,79	33,3	66,6	83,3	88,4
	<i>Ожидаемый эффект</i>					
4	в пробитах	4,88	5,45	5,55	5,70	5,80
5	в процентах	45,2	50,52	70,8	75,8	78,8
	<i>Разность между эффектами</i>					
6	в процентах	34,4	38,47	4,2	7,5	9,6
7	χ^2	0,48	0,54	0,009	0,03	0,05

$LD_{16} = 1712$ мг/кг; $LD_{50} = 1950$ мг/кг; и $LD_{84} = 2275$ мг/кг; $LD_{50} = 1950$ (1795 ÷ 2321) мг/кг при $P=0,05$.

II серия опыта проводилась на 30 крысах. Было сформировано 5 групп. Каждая доза изучалась на 6 крысах. После в/в введения субстанции в дозах: 600 и 700 мг/кг клиническая картина выражалась в кратковременном беспокойстве, гиперсаливации, учащении дыхания, появлении икотных движений, бледности мордочек, ушей, передних и задних конечностей, хвоста. Животные принимали корм, подвижны, реагировали на внешние раздражители. При повышении дозы до 800 мг/кг интенсивность, указанных проявлений усилилась. Животные стали бездейственными. При увеличении дозы до 900 мг/кг на фоне общей бледности и акроцианоза наблюдалась апатичность, усилилась влажность шерстного покрова, учащенное дыхание, адинамия и число погибших животных - 5. В дозе 1000 мг/кг в течение 2,5-3 часов погибли все животные при клинической картине интоксикации ($LD_{16} = 629$ мг/кг; $LD_{50} =$

717 мг/кг; ЛД₈₄ = 836 мг/кг; ЛД₅₀ = 717(623 ÷ 853) мг/кг при P = 0,05).

III-IV серии опыта проведены для сравнения с циклофосфамидом, который обладает умеренной токсичностью. ЛД₅₀ равняется 100 мг/кг при однократном в/б и в/в введениях (ЛД₁₆ = 88 мг/кг; ЛД₅₀ = 100 мг/кг; ЛД₈₄ = 117 мг/кг; ЛД₅₀ = 100 (87 ÷ 119) мг/кг и (ЛД₁₆ = 88 мг/кг; ЛД₅₀ = 100 мг/кг; ЛД₈₄ = 117 мг/кг; ЛД₅₀ = 100 (87 ÷ 95) мг/кг при P = 0,05).

Токсическое влияние однократно высокой дозы выражалось в ухудшении состояния животных, снижении массы тела, сонливости, вялости, появлении цистита, нарушения функции ЖКТ и угнетения гемопоэза. Возникают конъюнктивиты с мелкими кровоизлияниями, иногда некрозы на коже. Обладает слабой обратимостью токсического действия. Гибель животных после однократного введения препарата наступает через 1-1,5 часов и в течение трех недель.

Следует заметить, что ЛД₅₀ гликозил-НММ-1 19-20 раз больше, чем у циклофосфамида.

Известно, что препарат сравнения по свойствам и механизму действия отличается от других производных хлорэтиламина, располагает невысокой токсичностью, поскольку мыши менее чувствительны к нему. Обладает слабой обратимостью токсического действия (снижение массы тела, появление цистита, нарушение функции ЖКТ и угнетении гемопоэза). Возникают конъюнктивиты, мелкие кровоизлияния, иногда некрозы на коже [Проценко Л.Д., 1985; И.В. Березовская, 2003; Машковский М.Д., 2008; Зурдинов А.З., 2010].

Т.о., изучение острой токсичности гликозил-НММ-1 на животных при однократном в/б и в/в введениях показали, что ЛД₅₀ при в/б введении составляет 1950 мг/кг, а при в/в - 717 мг/кг, малотоксична, по степени токсичности относится к IV классу. ЛД₅₀ циклофосфамида соответствует 100 мг/кг, а у гликозил-НММ-1 при в/б введении 19-20 раз, а при в/в 7 раз больше, чем у препарата сравнения.

В данной главе описано морфологическое исследование органов животных под влиянием гликозил-НММ-1 при острой токсичности. В подслизистой оболочке желудка наблюдается лимфо-лейкоцитарная инфильтрация. В слизистой оболочке тонкого кишечника прослеживаются атрофические, дегенеративно-дистрофические изменения, воспалительная инфильтрация стромы и подслизистого слоя. В структуре почек наблюдаются незначительные изменения: набухание стенок и дегенерация эпителия канальцев, которые носят очаговый характер (рис. 1).

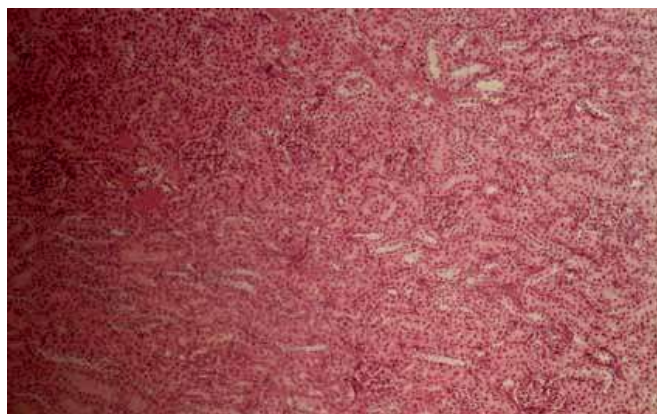


Рис. 1. Почка. Гликозил-НММ-1. 195 мг/кг. Мономорфные почечные клубочки, капиллярные петли ажурного рисунка. Канальцы обычной ширины. В корковом веществе - выраженные мозговые лучи. Окраска гематоксилин-эозином. x200.

Циклофосфамид оказывает деструктивно-дистрофические изменения, серозное воспаление, очаги микронекроза, нарушает детоксицирующую функцию печени; почек; ЦНС. Т.о., результаты морфологического изучения гликозил-НММ-1 показали, что отмечаются некоторые структурные изменения в изученных органах животных, признаков патологических изменений не обнаружено. После введения циклофосфамида в слизистой оболочке желудка, тонкого и толстого кишечника имеются атрофические, дистрофические изменения, воспалительная инфильтрация стромы и подслизистого слоя. В структуре печени наблюдается развитие жировой дистрофии и некроз печеночных клеток. В почках отмечается набухание стенок артериол и дегенерация эпителия канальцев. В селезенке и лимфатических узлах наблюдается уменьшение лимфоидных элементов.

Токсичность субстанции в условиях хронического эксперимента изучалась на 160 мышах и 240 крысах массой 20-22 г и 160—180 г обоих полов в соответствии «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», (М., 2012.) и «Временные методические рекомендации. Требования к доклиническому изучению общетоксического действия новых фармакологических веществ», (Б., 2000).

Было сформировано 8 групп: I-II - контрольные, III-VIII – опытные. С III-V группам (мыши и крысы) вводилось в/б гликозил-НММ-1 в дозах 1/5, 1/10 и 1/20 от ЛД₅₀ (40; 20 и 10 мг/кг) и (65; 33 и 16 мг/кг) и циклофосфамид (2; 1 и 0,5 мг/кг) и (3; 2 и 1 мг/кг) по 0,4 мл 1 раз в сутки в течение 1, 2 и 3-х месяцев.

Определение массы тела животных под влиянием гликозил-НММ-1 проводилось ежемесячно. В первые дни опыта масса тела животных, как у опытных (159,3 ± 7,26; 164,8 ± 5,08; 163,7 ± 3,92; 160,3 ± 6,20; 164,4 ± 6,03 и 161,6 ± 1,42), так и у контрольных групп (161,4 ± 6,12 и 167,9 ± 6,12) находилась в пределах физиологической нормы (рис. 2).

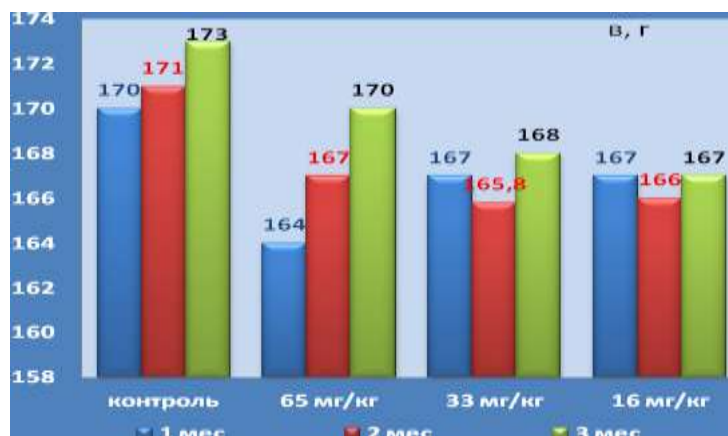


Рис. 2. Динамика массы тела у крыс при введении субстанции гликозил-НММ-1 в течение трех месяцев (абс. зн. $M \pm m$).

Однако средние значения массы тела имели групповые различия. В течение трех месяцев опыта, по сравнению с исходными данными ($161,4 \pm 4,91$ и $167,9 \pm 6,12$), масса тела у животных в контрольных группах ($167 \pm 6,14$; $165 \pm 7,51$ и $167 \pm 4,7$ в контроле 1) и ($170 \pm 6,66$; $171 \pm 8,19$ и $173 \pm 5,06$ в контроле 2) находились в норме. После введения гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг в течение трех месяцев прибавка в массе находилась ($164,6 \pm 5,7$, $167,13 \pm 5,27$ и $169,7 \pm 3,02$ против $170 \pm 6,66$; $171 \pm 8,19$ и $173 \pm 5,06$ в контроле 2) в пределах физиологических колебаний. В дозах 33 и 16 мг/кг потеря в массе тела ($166,4 \pm 4,8$; $165,8 \pm 9,2$; $167,8 \pm 6,8$; и $166,7 \pm 2,90$; $165,9 \pm 5,7$; $166,9 \pm 4,3$ против $170 \pm 6,66$; $171 \pm 8,19$ и $173 \pm 5,06$ в контроле 2) по сравнению с контролем 2 не наблюдалось. При введении циклофосфамида в дозе 3 мг/кг у животных потеря в массе составила ($163,4 \pm 4,91$; $164,3 \pm 5,27$; $167,1 \pm 7,6$ против $170 \pm 6,66$; $171 \pm 8,19$ и $173 \pm 5,06$ в контроле 2), в дозе 2 мг/кг наблюдалась утрата в массе тела ($163,2 \pm 4,8$; $164,8 \pm 7,2$; $177,5 \pm 3,7$) и в дозе 1 мг/кг отмечалась потеря в массе тела ($162,9 \pm 4,5$; $174,3 \pm 9,38$; $161 \pm 5,4$ против $170 \pm 6,66$; $171 \pm 8,19$ и $173 \pm 5,06$ в контроле 2 при $P \leq 0,05$). Результаты изучения гликозил-НММ-1 показали, что во все периоды наблюдения до опыта у животных, как у контрольных, так и у опытных групп, масса тела находилась в норме. При введении циклофосфамида у животных VI и VII опытных групп на 1-2-й месяц опыта, у VIII опытной группы в течение трех месяцев отмечалась потеря в массе тела. Следовательно, гликозил-НММ-1 в исследуемых дозах не изменяет массу тела. При введении циклофосфамида отмечалась потеря в массе тела.

Изучение пирогенного действия гликозил-НММ-1 и циклофосфамида на организм крыс изучалось до опыта ($36,2 \pm 0,2$) и через 1; 2 и 3 месяца ($36,6 \pm 0,2$; $35,8 \pm 0,3$ и $36,4 \pm 0,4$) измерением базальной температуры. Препарат считался выдержавшим испытание, если ни у одной из трех крыс в группе, повышение температуры не превышало $0,6^\circ\text{C}$, а по сумме трех измерений, не более чем на

1,4°C. После введения субстанции и циклофосфамида в дозах 65 и 3 мг / кг в течение трех месяцев у животных III и VI опытных групп, 4-х из испытанных групп, из III и (36,6 ± 0,2; 36,1 ± 0,3 и 35,8 ± 0,3; 36,6 ± 0,3, и 36,7 ± 0,3; 36,1 ± 0,5 против 36,1 ± 0,5 и 36,9 ± 0,5) VI групп (37,1 ± 0,4; 36,7 ± 0,2 и 36,7 ± 0,3; 36,9 ± 0,6 и 37,1 ± 0,3; 36,6 ± 0,5 против 36,7 ± 0,4 и 36,6 ± 0,4 в исходных значениях) разность температуры не превышала 0,6°C. Введение субстанции и циклофосфамида у животных, 4-х из испытанных групп, из III и VI опытных групп, разность температуры, не превышала 0,6°C по сравнению с исходными данными. Введение гликозил-НММ-1 и циклофосфамида в дозах 33 и 2 мг/кг на 2-й месяц опыта у животных IV и VII опытных групп, из 4-х из испытанных групп, у IV и (35,9 ± 0,4; 36,3 ± 0,4 и 36,5 ± 0,6; 36,7 ± 0,6 и 36,7 ± 0,4; 36,4 ± 0,4 против 36,6 ± 0,2 и 36,6 ± 0,2) VII групп (35,9 ± 0,5; 36,3 ± 0,3 и 36,6 ± 0,5; 37,1 ± 0,6 и 36,7 ± 0,3; 36,7 ± 0,5 против 36,6 ± 0,3 и 36,9 ± 0,4 в исходных значениях) не наблюдался подъема температуры на более 0,6°C.

При трехмесячном введении исследуемых средств в дозах 16 и 1 мг/кг у животных V и VIII опытных групп, 4-х из испытанных групп, у V и (36,4 ± 0,3; 36,2 ± 0,2 и 36,5 ± 0,4; 36,0 ± 0,4 и 36,5 ± 0,5; 37,0 ± 0,5 против 36,7 ± 0,4 и 36,6 ± 0,4) VIII группы (36,4 ± 0,4; 36,2 ± 0,3 и 36,5 ± 0,5; 36,0 ± 0,3 и 36,3 ± 0,6; 36,8 ± 0,4 против 36,0 ± 0,5 и 36,7 ± 0,3 в исх. знач.) температура не превышала 0,6°C по сравнению с исходными показателями.

Т.о., измерения ректальной температуры у крыс при введении гликозил-НММ-1 и циклофосфамида показали, что не обладают пирогенным действием.

Проведено изучение действия гликозил-НММ-1 и циклофосфамида на ССС и дыхательную систему методом записи биоэлектрической активности миокарда крыс ЭКК-01 во II стандартном отведении, с последующим анализом ЭКГ и подсчетом числа дыханий в 1 минуту.

Влияние гликозил-НММ-1 на деятельность сердца оценивалось по ЭКГ, где определялась форма зубцов, число сокращений в 1 минуту (Ps), величины интервалов R-R, Q-T и систолический показатель. Анализ ЭКГ и частоты дыхания показали, что гликозил-НММ-1 и циклофосфамид в течение трех месяцев, сопоставим с результатами II контрольной группы и не отличается от показателей нормы для животных. Т.о., гликозил-НММ-1 и циклофосфамид в течение трех месяцев не оказывают токсического действия на функции ССС и органов дыхания.

С целью выявления возможного отрицательного влияния гликозил-НММ-1 и препарата сравнения на эритро- и лейкопоз учитывались показатели гемоглобина, которые находились в норме. Эритроциты в крови у контрольных групп во все сроки эксперимента оставались на уровне исходных значений. Т.о., гликозил-НММ-1 и циклофосфамид не оказывают влияния на эритропоз (рис. 3).

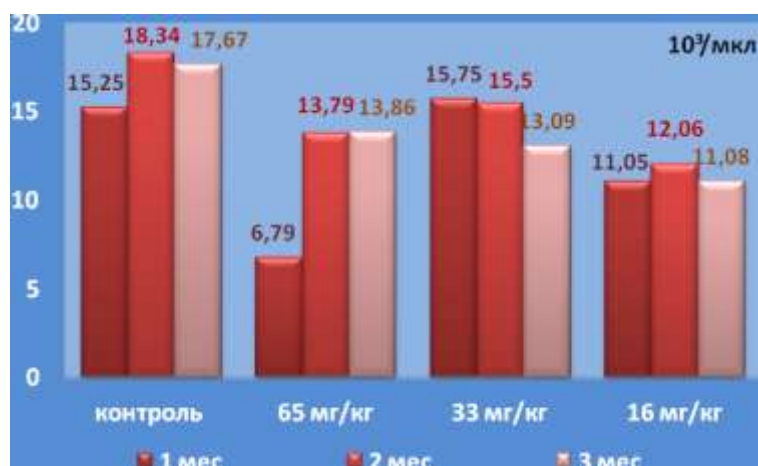


Рис. 3. Динамика показателей периферической крови у крыс при введении субстанции гликозил-НММ-1 ($P \leq 0,5$).

У контрольных животных общее количество лейкоцитов находилось в норме. После введения субстанции в дозе 65 мг/кг наблюдалась тенденция к незначительному снижению количества лейкоцитов ($6,79 \pm 0,35$ против $15,25 \pm 3,2$ в контроле 2 при $P \leq 0,5$) в периферической крови. После введения гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг у животных на 2-3-й месяц ($13,79 \pm 0,35$ и $13,86 \pm 0,78$ против $18,34 \pm 1,67$ и $17,67 \pm 1,75$ в контроле 2) лейкопении не отмечалось. Уровни абсолютного и относительного количества лимфоцитов и нейтрофилов находились в норме. У животных IV и V групп гликозил-НММ-1 в дозах 33 и 16 мг/кг снижения лейкоцитов в крови, лейкопении не вызывают.

Под влиянием циклофосфамида в дозе 3 мг/кг в крови у животных отмечалась выраженная лейкопения и тромбоцитопения. Показатели красной крови повышенные, наблюдается тенденция к угнетению миелопоэза $P \leq 0,05$. Т.о., применение гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг приводит к тенденции незначительной лейкопении. После введения субстанции в дозах 33 и 16 мг/кг со стороны крови лейкопении не наблюдается. Циклофосфамид приводит к более выраженной лейкопении, снижению содержания лимфоцитов в крови, тромбоцитопении, повышению показателей красной крови и к тенденции угнетения миелопоэза.

Изучалось действие гликозил-НММ-1 в дозах 65; 33 и 16 мг/кг на клеточные элементы костного мозга. В клеточном элементе мозга снижения количества лимфоцитов ($14,3 \pm 5,29$; $13 \pm 0,21$ и $14,3 \pm 0,01$ против $14,25 \pm 1,87$; $14,25 \pm 0,1$ и $13,5 \pm 0,2$ в контроле), моноцитов ($2,7 \pm 0,04$, $2,1 \pm 0,8$; $3 \pm 1,4$ против $3,25 \pm 0,2$; $2,5 \pm 0,5$ и $2,75 \pm 0,3$ в контроле 2), плазматических клеток ($0,1 \pm 0,03$; $0,7 \pm 0,07$; $1,0 \pm 0,08$ против $0,2 \pm 0,2$; $1,5 \pm 0,5$ и $0,7 \pm 0,2$ в контроле 2), ретикулоцитов ($0,3 \pm 0,02$; $0,2 \pm 0,1$; 0 против $0,2 \pm 0,01$; 0 ; 0), мегакариоцитов ($43,0 \pm 0,7$; $42,5 \pm 0,4$ и $33,25 \pm 0,25$ против $33,25 \pm 0,25$; $42,5 \pm 0,5$ и $42,75 \pm 0,50$ в контроле), повышения числа незрелых клеток миелоидного ряда ($0,25$; $12,5 \pm 0,5$ и $12,75 \pm 0,50$), снижения количества элементов эритропоэза, угнетения гемопоэза, индекса созревания эритробластов, костно-мозгового индекса нейтрофилов не наблюдалось.

Лейко-эритробластическое соотношение (1,4; 1,6 и 1,2 против 2 в контроле) в клеточном элементе костного мозга соответствует норме. Т.о., субстанция в дозе 65 мг/кг в клеточном элементе костного мозга не повышала число незрелых клеток миелоидного ряда, не уменьшалось количество элементов эритропоза и угнетения гемопоэза, миелограмма соответствовала норме. Гликозил-НММ-1 в дозе 33 мг/кг вызывал незначительное снижение клеток эритроидного ростка, с полным восстановлением миелограммы к концу наблюдения. Миелограмма в дозе 16 мг/кг не отличалась от контрольной группы. Циклофосфамид в дозах 3 и 2 мг/кг вызывает изменения во всех ростках кроветворения у крыс. В крови наблюдается выраженная лейкопения и тромбоцитопения ($P \leq 0,05$). Угнетение гемопоэза наблюдается 3—5 дней, затем наступала регенерация. Миелограмма нормализовалась через две недели. Результаты исследования свидетельствуют о том, что после введения гликозил-НММ-1 патологических сдвигов костно-мозгового кроветворения не вызывает. Циклофосфамид снижает содержание лимфоцитов, мегакариоцитов и лейко-эритробластическое соотношение ($P \leq 0,05$) в клеточном элементе костного мозга.

Результаты изучения влияния гликозил-НММ-1 и препарата сравнения на обмен веществ, определение биохимических показателей сыворотки крови у животных показали, что в дозе 65 мг/кг изменения количества общего белка ($6,8 \pm 0,17$ против $7,4 \pm 0,13$ г %) не наблюдалось. В дозах 33 и 16 мг/кг не уменьшалось количество общего белка в сыворотке крови ($7,6 \pm 0,15$ и $7,8 \pm 0,13$ против $7,4 \pm 0,13$ г % в контроле 2), снижения состава сывороточных белков: альбуминов, альбуминно-глобулинового коэффициента, не увеличивалось количества α -, β - и γ -глобулинов. После введения циклофосфамида в дозе 3 мг/кг у животных содержание общего белка уменьшалось ($6,7 \pm 0,12$ против $7,4 \pm 0,13$ в контроле 2), наблюдалась тенденция к снижению состава сывороточных белков: альбуминов, альбуминно-глобулинового коэффициента, увеличивалось количество α -, β - и γ -глобулинов ($P \leq 0,05$).

Исследования отдельных биохимических тестов, характеризующих состояние липидного обмена под влиянием гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг не отмечают изменения уровня общих липидов и β -липопротеидов в сыворотке крови ($2,8 \pm 0,35$ против $3,5 \pm 0,29$) и ($0,878 \pm 0,06$ против $0,885 \pm 0,7$ в контроле 2). После введения гликозил-НММ-1 в дозах 33 и 16 мг/кг не наблюдалось повышения уровня общих липидов и β -липопротеидов в сыворотке крови ($3,4 \pm 0,28$ и $3,6 \pm 0,25$ г/л против $3,5 \pm 0,29$ г/л) и ($0,881 \pm 0,07$ и $0,880 \pm 0,05$ г/л против $0,885 \pm 0,7$ г/л в контроле 2). (табл. 2, рис. 4). Циклофосфамид в дозе 3 мг/кг уменьшает содержание общего белка, уровень общих липидов и β -липопротеидов ($P \leq 0,05$).

Таблица 2 - Динамика биохимических показателей сыворотки крови крыс при введении гликозил-НММ-1 и циклофосфамида в течение трех месяцев

№ пп	Условия опыта, дозы	Общий белок, г %	Общие липиды, г/л	β -липопротеиды, г/л
1.	I группа - контроль	7,6 \pm 0,18	2,82 \pm 0,35	0,886 \pm 0,06
2.	II группа - контроль	7,4 \pm 0,13	3,5 \pm 0,29	0,885 \pm 0,7
3.	III гр.- 65 мг/кг	6,8 \pm 0,17	3,3 \pm 0,35	0,887 \pm 0,06
4.	IV гр. – 33 мг/кг	7,6 \pm 0,15	3,4 \pm 0,28	0,880 \pm 0,07
5.	V гр. – 16 мг/кг	7,8 \pm 0,23	3,6 \pm 0,25	0,889 \pm 0,05
6.	VI гр. – 3 мг/кг	6,7 \pm 0,12*	2,8 \pm 0,35 *	0,878 \pm 0,06*
7.	VII гр. – 2 мг/кг	7,6 \pm 0,25	3,3 \pm 0,27	0,881 \pm 0,07
8.	VIII гр. – 0,5 мг/кг	7,7 \pm 0,23	3,0 \pm 0,22	0,880 \pm 0,05

Примечание: знаком* отмечены значения, статистически значимо отличающиеся от контроля, при $P \leq 0,05$.

В дозах 2 и 1 мг/кг содержание липидов и β -липопротеидов в сыворотке крови в пределах нормы. Т.о., гликозил-НММ-1 в исследуемых дозах в течение трех месяцев не вызывает изменения количества общего белка, уровня липидов и β -липопротеидов в сыворотке крови. Циклофосфамид в дозе 3 мг/кг уменьшает содержание общего белка, уровень общих липидов и β -липопротеидов сыворотки крови.

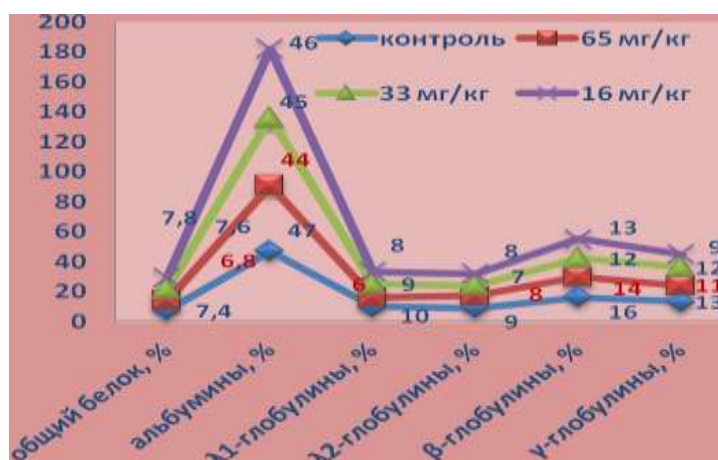


Рис. 4. Показатели общего белка и белковых фракций сыворотки крови у крыс под влиянием гликозил-НММ-1 ($P \leq 0,05$).

Результаты изучения гликозил-НММ-1 показали, что в исследуемых дозах в течение трех месяцев содержание креатинина ($115,8 \pm 5,3$; $119,4 \pm 6,4$ и $114,6 \pm 7,8$ против $120,7 \pm 6,2$), мочевины ($8,3 \pm 0,22$; $7,6 \pm 0,41$ и $8,1 \pm 0,53$ против $7,5 \pm 0,33$), остаточного азота ($20,6 \pm 3,5$; $20,2 \pm 3,7$ и $20,1 \pm 2,7$ против $21 \pm 3,6$) и холестерина крови ($6,6 \pm 0,18$; $6,2 \pm 0,14$ и $6,1 \pm 0,24$ против $6,9 \pm 0,19$ в контроле 2) находилось в пределах нормы. Циклофосфамид в дозе 3 мг/кг повышает содержание холестерина ($13,9 \pm 0,41$ против $5,1 \pm 0,24$), креатинина ($128,5 \pm 7,5$; против $114,6 \pm 7,8$), мочевины ($15,5 \pm 0,30$ против $8,1 \pm 0,53$) и

остаточного азота ($28,6 \pm 2,6$ против $20,1 \pm 2,7$ в контроле 2 при $P \leq 0,05$). В дозах 2 и 1 мг/кг не повышает содержание холестерина ($8,3 \pm 0,22$ и $6,9 \pm 0,18$ против $5,1 \pm 0,24$), креатинина ($124,0 \pm 6,7$ и $120,7 \pm 6,9$ против $114,6 \pm 7,8$), мочевины ($12,3 \pm 0,39$ и $10,1 \pm 0,09$ против $8,1 \pm 0,53$) и остаточного азота ($25,1 \pm 4,3$ и $19,4 \pm 2,6$ против $20,1 \pm 2,7$ в контроле 2).

Влияние субстанции и циклофосфамида в испытываемых дозах в течение трех месяцев на островковую часть поджелудочной железы определялось по изменению содержания глюкозы в крови на селективном анализаторе фирмы Грайнер. Отсутствие глюкозурии показало, что не влияют на инсулярный аппарат поджелудочной железы. Проведено изучение влияния средств на содержание глюкозы. Установлено, что гликозил-НММ-1 и циклофосфамид в испытываемых дозах не повышают уровень глюкозы в крови ($4,8 \pm 0,21$; $4,7 \pm 0,19$ и $5,0 \pm 0,22$) и ($6,0 \pm 0,20$; $4,9 \pm 0,17$ и $5,0 \pm 0,23$ против $4,5 \pm 0,16$ в контроле 2). Исходя из полученных результатов, можно считать, что изучаемая субстанции и циклофосфамид не вызывают глюкозурию и диабетогенного эффекта.

Действие субстанции и препарата сравнения на активность неспецифических оксидаз печени оценивалось по продолжительности сна животных после введения гексенала (Plea et al., 1958). Определялась масса тела животных и в/б вводился раствор гексенала в дозе 90 мг/кг на растворе хлорида натрия (0,9 %). При введении гликозил-НММ-1 в дозах 65; 33 и 16 мг/кг активность неспецифических оксидаз печени оценивалась по продолжительности сна. Как показали результаты наших исследований, полученные при этом данные находились в норме ($0,22 \pm 0,01$; $0,20 \pm 0,03$; $0,21 \pm 0,12$ и $0,18 \pm 0,41$; $0,15 \pm 0,31$; $0,14 \pm 0,12$ против $0,24 \pm 0,02$ и $0,12 \pm 0,08$ в контролях 2). В дозе 33 мг/кг продолжительность сна находилась в пределах нормы. В дозе 16 мг/кг через 3 месяца у животных продолжительность сна оставалась прежней. Под влиянием циклофосфамида в дозах 3; 2 и 1 мг/кг снижается содержание альдолазы, пероксидазы крови, повышается аспаратаминотрансфераза (АСТ) ($1,9 \pm 0,07$ против $0,12 \pm 0,08$ в контроле 2 при $P \leq 0,05$). В дозах 2 и 1 мг/кг активность АСТ ($0,90 \pm 0,06$ и $0,80 \pm 0,027$ против $0,24 \pm 0,02$ в контроле 2) не изменяется. Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) в исследуемых дозах ($1,05 \pm 0,17$; $0,90 \pm 0,06$ и $0,80 \pm 0,027$ против $0,24 \pm 0,02$ в контроле 2) в пределах нормы. Результаты опыта показали, что введение субстанции в испытываемых дозах в течение трех месяцев не влияет на активность неспецифических оксидаз печени, оцениваемую по продолжительности сна. После введения циклофосфамида через месяц в дозах 3 и 2 мг/кг у животных продолжительность сна уменьшилась, а в дозе 1 мг/кг находилась в норме. Через месяц эксперимента в дозе 3 мг/кг у животных сон стала короче, в дозе 2 мг/кг незначительно увеличилась, а в дозе 1 мг/кг оставалась в пределах нормы. В течение трех

месяцев опыта у животных в дозе 3 мг/кг продолжительность сна стала меньше, а в дозе 2 и 1 мг/кг длительность сна увеличилась. Т.о., гликозил-НММ-1 не влияет на активность неспецифических оксидаз печени, оцениваемую по продолжительности сна и не оказывает отрицательного действия на детоксицирующую функцию печени. Циклофосфамид вызывает снижение данной функции печени.

Функциональное состояние мочевыводящей системы оценивалось по величине диуреза и анализу мочи. Проводилась оценка функциональной активности почек и анализа мочи по секреции фенол-красного до опыта, через 1, 2 и 3 месяца после начала введения субстанции и препарата сравнения. При введении гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг у животных в течение трех месяцев отмечалось незначительное возрастание функции почек ($0,097 \pm 0,005$ и $0,100 \pm 0,006$ против $0,091 \pm 0,004$ и $0,095 \pm 0,010$ при $P \leq 0,5$), которое нормализовалось в восстановительный период. Выделения сахара с мочой не обнаружено. Субстанция в дозах: 33 и 16 мг/кг ($0,098 \pm 0,006$; $0,095 \pm 0,005$ и $0,097 \pm 0,004$; $0,091 \pm 0,002$ против $0,091 \pm 0,004$ и $0,095 \pm 0,010$ в контроле 2) через 2-3 месяца опыта и в течение трех месяцев опыта возрастания и изменения диуреза не наблюдалось. При введении циклофосфамида в дозе 3 мг/кг снижается диурез, появляются дизурия и гематурия $P \leq 0,05$. Следовательно, гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг в течение трех месяцев не изменяет выделительную функцию почек. Циклофосфамид в дозе 3 мг/кг нарушает функцию почек и снижает суточный диурез, в дозе 2 мг/кг уменьшает суточный диурез.

Для оценки влияния гликозил-НММ-1 и препарата сравнения на функции ЦНС животных проведено изучение нейродинамической активности (поведенческие реакции). До начала введения средств изучались исходные данные путем тестирования в «открытом поле». В течение двух минут регистрировалось число перемещений из квадрата в квадрат, вставаний на задние лапки – вертикальные перемещения, заглядываний в отверстия, умываний и количество вегетативного компонента. Полученные данные сравнивались с результатами повторных исследований ориентировочно-исследовательского поведения животных, проводимых один раз в месяц в течение трех месяцев. Введение субстанции в дозе 65 мг/кг у животных не вызывало статистически достоверных изменений уровня горизонтального перемещения и исследовательских реакций. Количество умываний увеличилось статистически незначительно ($0,6 \pm 0,38$; $6,8 \pm 0,52$; $7,0 \pm 0,44$ против $0,1 \pm 0,61$; $1,9 \pm 0,57$; $3,4 \pm 0,62$). При этом несколько снижался вегетативный компонент ($1,1 \pm 0,21$; $1,0 \pm 0,27$; 0 против $6,6 \pm 0,25$; $4,9 \pm 0,33$; 0 при $P \leq 0,5$). У животных в течение трех месяцев отмечалось снижение уровня горизонтального перемещения и исследовательских реакций поведения в «открытом поле» по сравнению с исходными данными. Однако, отчетливой закономерности

выявленных изменений в поведении у мышей через 2 месяца опыта не прослеживалось. Через 3 месяца опыта привело к статистически значимому уменьшению числа горизонтальных перемещений и заглядываний в отверстия ($7,7 \pm 1,56$ и $0,9 \pm 0,64$ против $13,7 \pm 1,72$ и $1,3 \pm 0,97$ в контроле 2 при $P \leq 0,05$), что указывает на незначительное снижение уровней общей двигательной и исследовательской активности в поведении животных ($11,4 \pm 2,18$; $1,6 \pm 0,71$; $1,6 \pm 0,84$ против $15,7 \pm 5,29$; $5,6 \pm 0,98$; $4,3 \pm 0,70$ в исходных значениях). Статистически число вертикальных перемещений и количество дефекаций уменьшилось по сравнению с исходными данными. У животных, получавших гликозил-НММ-1 в дозах 33 и 16 мг/кг в течение трех месяцев уровень показателей поведения не претерпел достоверных изменений. Результаты тестирования мышей, получавших субстанцию в дозе 40 мг/кг в течение трех месяцев опыта аналогичны данным, полученным к концу двухмесячного введения гликозил-НММ-1. Тестирование животных, получавших циклофосфамид в дозе 2 мг/кг вызывало некоторое уменьшение всех уровней исследованных показателей в «открытом поле» по сравнению с повторными данными в период наблюдения ($P \leq 0,05$). В дозе 1 мг/кг наблюдалось незначительное понижение уровня горизонтального передвижения и исследовательских реакций. Количество умываний увеличилось статистически незначимо, несколько снизился вегетативный компонент, сократились все регистрируемые показатели поведения мышей в «открытом поле» ($P \leq 0,5$). В дозе 0,5 мг/кг стало меньше уровня горизонтального перемещения и исследовательских реакций в поведении животных по сравнению с исходными данными в период наблюдения в течение двух месяцев ($P \leq 0,5$). Т.о., гликозил-НММ-1 и циклофосфамид в исследуемых дозах не нарушают поведенческие реакции у животных в тесте «открытого поля».

Нами проведено изучение влияния исследуемой субстанции и циклофосфамида на состояние ЦНС у животных: ориентировочные рефлексы с использованием теста «залезания на сетку», тонус скелетной мускулатуры на рефлекс «боковое положение», миерелаксирующего действия «подтягивания» задних конечностей и координацию движения с помощью теста «вращающийся стержень». опыты проведены на мышах, в ходе эксперимента животные тестировались до начала курса введения средств и полученные данные сравнивались с результатами повторных исследований через 1, 2 и 3 месяца.

Действие гликозил-НММ-1 и циклофосфамида на состояние ориентировочных рефлексов изучалось на мышах, с использованием теста «залезания на сетку». В ходе опыта регистрировалось количество мышей, поднявшихся в течение 5 минут по проволочной сетке, натянутой под углом 60° в верхний затемненный отсек камеры. Количество животных, поднявшихся в течение 5 минут по проволочной сетке, получавших субстанцию в дозе 40 мг/кг

через месяц ($13,4 \pm 0,6$; $13,3 \pm 0,4$; $12,3 \pm 0,8$; $10 \pm 0,7$ и $8 \pm 0,9$ против $14,6 \pm 0,6$; $13,2 \pm 0,3$; $12 \pm 0,9$; $9,8 \pm 0,6$; $13,1 \pm 0,6$ при ($P \leq 0,5$), стало чуть меньше количества поднявшихся животных, чем до опыта по сравнению с контролем. После введения субстанции в дозах 20 и 10 мг/кг количество животных, поднявшихся по проволочной сетке, оставалось прежним, не уменьшалось. Результаты проведенных опытов показали, что при введении гликозил-НММ-1 в дозе 40 мг/кг в течение месяца не наблюдалось уменьшения количества животных, поднявшихся в течение 5 минут по проволочной сетке. После введения циклофосамида в дозах 2; 1 и 0,5 мг/кг у животных не отмечалось снижения ориентировочного рефлекса, поднявшихся в течение 5 минут по проволочной сетке по сравнению с контролем. Критерием эффекта утраты рефлекса «положения» служил помещение животного на спину на протяжении 2-х минут. Регистрировался процент животных, сохранявших «боковое положение» 2 минуты, которое не было утрачено.

Изучение влияния гликозил-НММ-1 и препарата сравнения на рефлекс «подтягивания» задних конечностей проводилось с целью выявления миерелаксирующего действия. Оценивалась способность животных нарушать реакцию «подтягивания» задних конечностей при помещении передних, на горизонтально натянутую проволоку. Результаты опыта показали, что при помещении передних конечностей на натянутую проволоку у всех животных в исследуемых дозах, реакция «подтягивания» задних конечностей не нарушалась. Т.о., гликозил-НММ-1 и циклофосамид не понижают поведенческие реакции у животных; ориентировочные рефлексы и не вызывают миерелаксирующего действия.

Влияние субстанции и циклофосамида на координацию движения у животных оценивалось с помощью теста «вращающегося стержня». Мыши опытных групп помещались на горизонтальный стержень диаметром 2 см, вращающийся со скоростью 5 оборотов в минуту. В течение двух минут все животные под действием препаратов удерживали равновесие на стержне. Следовательно, гликозил-НММ-1 и циклофосамид не нарушают координацию движения. Результаты изучения ЦНС и нейродинамической активности у животных показали, что субстанция и циклофосамид не понижают поведенческие реакции у животных; ориентировочные рефлексы, не вызывают миерелаксирующего действия и не нарушают координацию движения.

Т.о., в условиях хронического эксперимента гликозил-НММ-1 не вызывает потерю в массе тела у животных, не повышает ректальную температуру, не оказывает токсического действия на функции ССС и органов дыхания; приводит к тенденции незначительной лейкопении, не влияет на клеточные элементы костного мозга, не вызывает снижения количества общего белка, не повышает уровень липидов, β -липопротеидов сыворотки крови, не

оказывает отрицательного действия на детоксицирующую функцию печени, не изменяет выделительную функцию почек, не понижает функции ЦНС, не снижает ориентировочные рефлексy, сохраняет рефлекс «положения», не вызывает миерелаксирующего эффекта, «подтягивания» задних конечностей, не нарушает координацию движения по тесту «вращающегося стержня». Циклофосфамид в дозе 3 мг/кг приводит к выраженной лейкопении, снижению содержания относительного и абсолютного количества лимфоцитов в крови, вызывает потерю в массе тела у животных, не обладает пирогенным свойством, не оказывает токсического действия на функции ССС и органов дыхания, снижает содержание общего белка в сыворотке крови, уровень липидов и β -липопротеидов, нарушает функцию почек и снижает суточный диурез; и функции ЦНС. В дозах 3 и 2 мг/кг уменьшает детоксицирующие функции печени; суточный диурез незначительно; снижает функции ЦНС; 2 и 1 мг/кг вызывает тромбоцитопению, повышение показателей красной крови, тенденцию к угнетению миелопоэза; снижает содержание лимфоцитов, мегакариоцитов и лейко-эритробластического соотношения в клеточном элементе костного мозга; уменьшает содержание общего белка, увеличивает липиды и β -липопротеиды и не обладает диабетогенным эффектом; незначительно снижает нейродинамическую активность и функции ЦНС.

Морфологическое исследование в условиях хронического эксперимента показало, что гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг вызывает у животных незначительные изменения в структуре отдельных органов: желудка, тонкого и толстого кишечника, почек, носящие адаптивный характер (рис. 5).



Рис. 5. Тонкий кишечник. Гликозил-НММ-1. 65 мг/кг. Поверхностный эпителий ворсин уплощен, контуры нечеткие, некротизированы. Энтероциты дистрофически изменены. В строме лимфоидно-клеточная инфильтрация. Сосуды и капилляры полнокровны. Окраска гематоксилин-эозином. $\times 200$

Субстанция в дозе 65 мг/кг не вызывает увеличения массы печени ($2880 \pm 23,20$ против $3471 \pm 63,0$); надпочечников ($9,61 \pm 0,63$ против $6,80 \pm 0,68$);

селезенки ($330 \pm 26,0$ против $332 \pm 24,01$); тимуса ($25,5 \pm 0,21$ и $26,6 \pm 5,77$) и лимфоузлов ($4,29 \pm 0,19$ против $3,79 \pm 0,11$ в контроле при ($P \leq 0,5$), что свидетельствует о нетоксичности субстанции, отсутствии кумулятивного эффекта и мутагенной активности. В костном мозге у животных при использовании гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг не увеличивалось число незрелых клеток миелоидного ряда, не уменьшалось количество элементов эритропоэза и угнетения гемопоэза.

Т.о., результаты морфологического изучения хронической токсичности гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг показало, что субстанция оказывает действие на структуру желудка, тонкого и толстого кишечника, почек, носящее адаптивный характер в сроке одного месяца. Структурные изменения в почках выявлены в сроке наблюдения два месяца. Субстанция в дозе 33 мг/кг не снижает клетки эритроидного ростка. В большинстве изученных органах определяется отсутствие изменений в микроструктуре, что свидетельствует о нетоксичности гликозил-НММ-1. Циклофосфамид в дозе 3 мг/кг в почках вызывает набухание стенок артериол, дегенерацию эпителия канальцев; в щитовидной железе торможение накопления клеточных элементов в соединительной ткани, уменьшает количество и активность перитонеальных макрофагов; оказывает деструктивные и дистрофические изменения в печени, с появлением серозного воспаления, очагов микронекроза; незначительно влияет на желудок, кишечник; нестойко (5 дней) угнетает гемопоэз, после чего наступает быстрая регенерация, миелограмма нормализуется через две недели; в дозах 2 и 1 мг/кг вызывает тенденцию к угнетению миелопоэза; снижает содержание лимфоцитов, мегакариоцитов и лейко-эритробластическое соотношение в костном мозге; функции ЦНС; некроз клеток, развитие жировой дистрофии, дегенеративно-дистрофические обратимые изменения в печени, селезенке; лимфоидных органов; отмечаются атрофические изменения, воспалительная инфильтрация желудка, кишечника; вызывает набухание стенок артериол и дегенерацию эпителия канальцев почек.

В V главе «Изучение специфической ПОА гликозил-НММ-1 на животных-опухоленосителях с АОЭ (диплоидный вариант)» содержатся результаты исследования ПОА субстанции и препарата сравнения. Результаты исследования асцитного варианта АОЭ показали, что гликозил-НММ-1 в дозе 40 мг/кг снижает массу тела у опухоленосителей до нормы, полностью уменьшая объем опухоли и ПО эффект равен 93%, вызывает значительное снижение лейкоцитов в крови до нормы (рис. 6).

Циклофосфамид уменьшает массу тела у опухоленосителей в 2 раза меньше; угнетает лейкопоэз: относительное и абсолютное количество лимфоцитов, вследствие чего, вызывает выраженную лейкопению, общее

количество лейкоцитов в периферической крови снижается наполовину ($P \leq 0,05$); ТРО составляет 47 %. Менее чувствительна к препарату сравнения перевивная АОЭ.

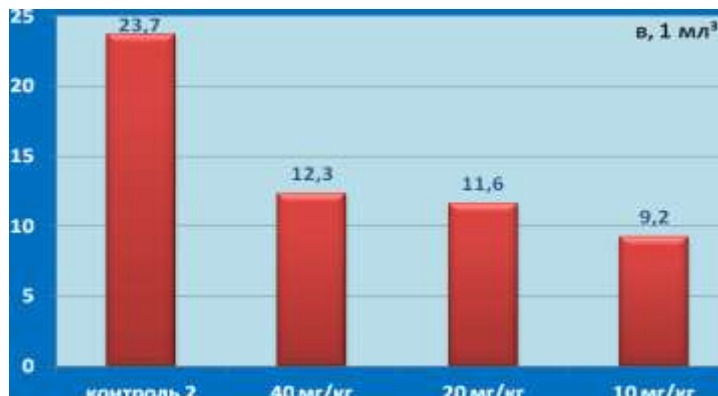


Рис. 6. Содержание лейкоцитов в периферической крови у мышей при асцитном варианте АОЭ при введении гликозил-НММ-1 ($P \leq 0,5$).

При цитологическом исследовании асцитной опухоли выявлены отдельно лежащие клетки в различных положениях. В препаратах контрольной группы наблюдались признаки апоптоза в виде «протуберанцев» цитоплазмы. Опухолевые клетки окрашивались интенсивно, находились в состоянии лизиса с образованием клеток-«теней». В дозах 40; 20 и 10 мг/кг на фоне гликозил-НММ-1 опухолевые клетки заметно уменьшились. Обнаружены мезотелиальные клетки с апоптозом в периоде лизиса с формированием клеток-«теней». Что же касается результатов патоморфологического изучения специфической ПОА гликозил-НММ-1 при асцитном варианте АОЭ, то они показали, что в структуре органов у опухоленосителей ПО эффект проявляется повреждением опухолевой ткани: полиморфизм клеток, образование многоядерных клеток и очагов некроза. В клетках опухоли наблюдаются дегенеративно-дистрофические изменения, которые приводят их к гибели и лизису. На месте гибели опухолевых клеток и вокруг зоны некроза наблюдается разрастание соединительной ткани. Кровеносные сосуды расширены и повышена проницаемость сосудистой стенки.

Цитологический анализ показал, что после введения циклофосфамида в дозе 2 мг/кг опухолевые клетки незначительно уменьшились. Обнаружены мезотелиальные клетки с начальными признаками апоптоза. Опухолевые клетки находились в состоянии лизиса с образованием клеток - «теней». В дозах 1 и 0,5 мг/кг опухолевые клетки уменьшились незначительно. Просматривались мезотелиальные клетки. Результаты опытов подтвердили данные других авторов о действии циклофосфамида на структуру органов: в ЖКТ вызывает: атрофические, дегенеративные изменения кишечника, воспалительная инфильтрация стромы, подслизистого слоя; деструктивные изменения, серозное воспаление, очаги микронекроза в печени; оказывает токсическое действие на почки: набухание стенок артериол, дегенерация

эпителия канальцев, изменения в эндокринной системе; снижает функцию щитовидной железы; наблюдаются очаги гемопоэза в стволовых гемопоэтических клетках; в соединительной ткани происходит торможение накопления клеточных элементов, уменьшается активность макрофагов.

Изучение специфической ПОА гликозил-НММ-1 на п/к варианте АОЭ позволяет говорить о преимуществе изучаемой субстанции, которая в исследуемых дозах снижает массу тела у опухоленосителей до нормы; масса опухоли на 7-й, 14-й и 21-е дни почти полностью уменьшилась; ТРО составило 97 %, СПЖ равняется 81%, ПОА оценивалась по УПЖ (175 дней); уменьшалось количество лейкоцитов в крови до нормы (рис. 7).

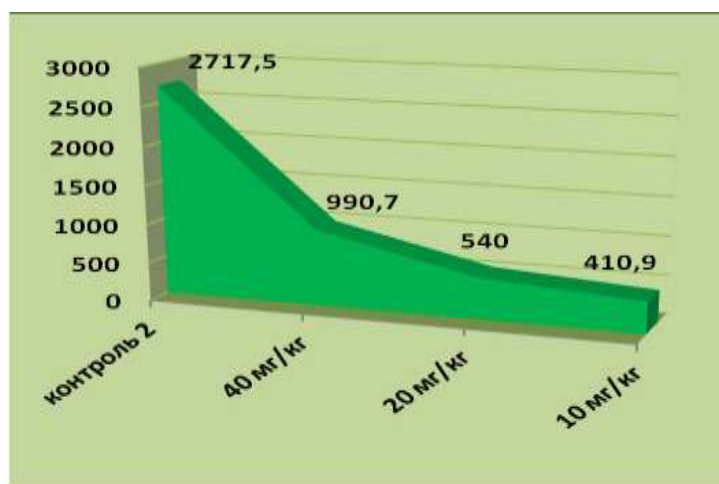


Рис. 7. Влияние субстанции гликозил-НММ-1 на массу подкожной опухоли Эрлиха на 21-й день опыта ($P \leq 0,05$).

Следовательно, гликозил-НММ-1 соответствует критериям ПОА в первичном скрининге по отбору ПО препаратов. Под влиянием препарата сравнения масса опухоли уменьшилась в 2 раза, ТРО составило 47 %, происходило угнетение лейкопоэза за счет относительного и абсолютного количества лимфоидных элементов крови, незначительно снизилось количество лейкоцитов по сравнению с контрольными животными-опухоленосителями. Препарат сравнения также соответствует критериям ПОА. Результаты патоморфологического исследования внутренних органов и тканей также свидетельствуют о том, что в микроструктуре органов у опухоленосителей происходят аналогичные изменения, как при специфической ПОА асцитного варианта АОЭ.

Т.о., изучение специфической ПОА на модели асцитной опухоли показало, что гликозил-НММ-1 уменьшает массу у опухоленосителей, происходит спад опухоли, увеличивается ПО эффект, снижаются лейкоциты в крови до нормы, ПОА составляет 93%. При п/к варианте на 7-й, 14-й и 21-е дни опыта субстанция вызывает полное уменьшение массы опухоли и лейкоциты в крови до нормы, СПЖ - 81 %, УПЖ - 175 дней, ТРО - 97 %. Циклофосфамид в 2 раза уменьшает массу тела, объем опухоли, лейкоциты в крови, угнетает

лейкопоз за счет относительного и абсолютного количества лимфоцитов; ТРО – 47 %. К препарату сравнения менее чувствительна перевивная АОЭ.

При цитологическом изучении асцитной опухоли выявлены отдельно лежащие клетки в различных положениях. В препаратах контрольной группы наблюдались признаки апоптоза в виде «протуберанцев» цитоплазмы. Опухолевые клетки окрашивались интенсивно, находились в состоянии лизиса с образованием клеток-«теней». В дозе 40; 20 и 10 мг/кг на фоне гликозил-НММ-1 опухолевые клетки уменьшились. Обнаружены мезотелиальные клетки с апоптозом в периоде лизиса с формированием клеток-«теней». Патоморфологическое изучение специфической ПОА субстанции при АОЭ (диплоидный вариант) проявляется морфологическими признаками повреждения опухолевой ткани: появляются многоядерные клетки, очаги некроза, выраженные дегенеративно-дистрофические изменения, гибель и лизис клеток. Вокруг зоны некроза разрастается соединительная ткань; кровеносные сосуды расширены, проницаемость сосудов повышена.

После введения циклофосфамида в дозе 2 мг/кг опухолевые клетки уменьшились. Обнаружены мезотелиальные клетки с начальными признаками апоптоза. Опухолевые клетки находились в состоянии лизиса с образованием клеток-«теней». В дозах 1 и 0,5 мг/кг опухолевые клетки уменьшились незначительно. Просматривались мезотелиальные клетки. Патоморфологическое исследование показало, что циклофосфамид приводит к расширению сосудов печени: появляются очаги гемопоэза в стволовых гемопоэтических клетках, перитонеальные макрофаги в рыхлой соединительной ткани. Происходит набухание стенок артериол в почках, дегенерации эпителияканальцев, атрофические и дистрофические изменения слизистой желудка, кишечника; воспалительная инфильтрация стромы и подслизистого слоя; угнетает митотическую активность опухолевой ткани; отмечается дисконкомплексация и резкий полиморфизм клеток, большое количество гигантских многоядерных клеток, патологические митозы, множественные очаги некроза; выраженные дегенеративно-дистрофические изменения в клетках опухоли, приводящие к гибели и лизису; на месте гибели опухолевых клеток и вокруг зоны некроза разрастается соединительная ткань, расширяются сосуды, повышается плотность капиллярного русла и дренажные свойства сосудистой стенки. Субстанция и циклофосфамид соответствуют критериям ПО действия в первичном скрининге по отбору ПО средств.

Глава VI «Изучению фармако-токсикологических свойств гликозил-НММ-1 в сравнении с циклофосфамидом». Проводилось исследование местно-раздражающего действия субстанции. Результаты I серии опыта показали, что после введения субстанции в течение недели у животных в месте введения на коже и в подлежащей мышечной ткани боковой поверхности области живота местно-раздражающего действия не наблюдается. Во II серии

опыта субстанция гликозил-НММ-1 на коже и слизистой оболочке нижнего века глаз местно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия не проявляют. Показатели периферической крови у опытных групп, получавших субстанции, в исследуемых дозах, находились в пределах нормы. Морфологическое изучение кожи и подлежащей мышечной ткани, слизистой оболочки нижнего века глаз под влиянием субстанции сравнения в течение недели показало отсутствие местно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия. Следовательно, гликозил-НММ-1 в исследуемых дозах в течение недели у животных в месте введения на коже и в подлежащей мышечной ткани боковой поверхности области живота и слизистой оболочке нижнего века глаз местно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия не проявляет. Циклофосфамид обладает слабо выраженной лейкотоксичностью, отмечается выраженная лейкопения, тромбоцитопения, в МПД (максимально переносимая доза) - нестойкое угнетение гемопоэза. Морфологическое изучение кожи и подлежащей мышечной ткани, слизистой оболочки глаз показало отсутствие местно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия.

Проведено изучение возможного аллергического действия субстанции в исследуемых дозах при 28-и дневном введении в двух сериях опыта по общепринятой методике, которое показало отсутствие кожно-резорбтивного действия, аллергической реакции и падения общего числа лейкоцитов в крови. Исследования микроструктуры внутренних органов показали отсутствие аллергического действия. Т.о., гликозил-НММ-1 в исследуемых дозах при 28-дневном введении в двух сериях опыта показали отсутствие кожно-резорбтивного и аллергического действия.

Изучение возможных кумулятивных свойств гликозил-НММ-1 проводилось по "тесту субхронической токсичности", который основан на возможности оценки адаптации к субстанции. Исследования показали, что гликозил-НММ-1 при многократном введении не обладает кумулирующей способностью. Для НАМ характерно быстрое исчезновение из крови, субстанция близка к другим НАМ (НММ, араноза и др.) по продолжительности циркуляции крови. После введения циклофосфамида в МПД через 24 часа полное исчезновение проявлений токсичности наблюдается через 26 дней, обладает высокой кумулирующей способностью и низкой обратимостью токсического действия. Следовательно, гликозил-НММ-1 не обладает кумулятивными свойствами. Циклофосфамид имеет высокую кумулирующую способность и низкую обратимость токсического действия.

Для оценки состояния иммунной системы у животных под влиянием гликозил-НММ-1, использовались тесты I-II уровней исследования в микроварианте (табл. 3).

Результаты исследования показали, что после введения изучаемой субстанции способность организма к формированию полноценного иммунитета

выражается в фазе выраженных или повышенных иммунологических сдвигов: содержание нейтрофилов, относительные значения Т- и В-лимфоцитов, теофиллинрезистентных и -чувствительных розеткообразующих клеток.

Таблица 3 – Влияние гликозил-НММ-1 на показатели фагоцитоза у мышей

№ пп	Показатели	Статисти- ческие показатели	Контроль II группа	Дозы, гликозил-НММ-1		
				III группа	IV группа	V группа
				40 мг/кг	20 мг/кг	10 мг/кг
1	Фагоцитарная активность, %	n	10	10	10	10
2		M±m	58,5±5,83	38,3±1,42	47,2±2,86	57,9±2,96
3		P		≤0,02	≤0,05	≤0,001
4	Фагоцитарное число	n	10	10	10	10
5		M±m	4,07±0,15	2,74±0,12	2,60±0,14	3,15±0,06
6		P		≤0,001	≤0,001	≤0,001
7	Нейтрофилы, %	n	10	10	10	10
8		M±m	24,3±1,86	35,8±0,86	36,4±1,36	35,2±1,39
9		P		≤0,01	≤0,01	≤0,001

Примечание: P – достоверность различий опытных и контрольных групп.

В крови у мышей в дозе 40 мг/кг основные показатели иммунной системы остаются без изменений. Циклофосфамид оказывает выраженное иммунодепрессивное действие, снижает фагоцитарную активность лейкоцитов, уменьшает бактерицидность крови, способность лимфоцитов к бласттрансформации, повреждает различные популяции лимфоцитов, в частности В-системы и др. Анализ результатов иммунотоксического действия при введении гликозил-НММ-1 в испытуемых дозах показал, что не вызывает стимуляцию роста лимфоидно-клеточных элементов иммунокомпетентных органов. В I серии опыта при оценке фагоцитарных параметров, установлено, что имеется снижение поглотительной активности нейтрофилов, но эти показатели были в норме. Фагоцитарная активность нейтрофилов отставала по сравнению с контрольной группой ($P \leq 0,1$), у животных, получавших субстанцию в дозе 10 мг/кг оставалась без изменений. Введение субстанции в дозе 40 мг/кг на число АОК ($1036 \pm 71,7$) (95,1% к контролю) отрицательного влияния не оказывало. Подобный максимальный эффект наблюдался в дозах 20 и 10 мг/кг ($1253,1 \pm 71,7$ и $1253,2 \pm 122,6$), что сравнимо для первичной иммунизации. Количественные и качественные изменения были сходны во всех дозах субстанции. Такое совпадение результатов предполагает о том, что способность организма к формированию полноценного иммунного ответа не нарушено. Во II серии опыта иммунорегуляторный индекс крови у мышей гликозил-НММ-1 в дозе 10 мг/кг полностью сохранен, исключения составляет ИРИ в испытуемых дозах, который оставался повышенным. Наблюдаются

статистически достоверные увеличения содержания нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе, что свидетельствует, о лучших компенсаторных возможностях организма у мышей, т.к. этот процесс сопровождается сохранением фагоцитарной активности у животных, получавших субстанцию в дозе 10 мг/кг по сравнению с контролем ($57,9 \pm 2,96$, против $58,5 \pm 2,96$). Данные изменения можно интерпретировать как сохранение функциональных способностей нейтрофилов компенсаторного характера. В III серии опыта при введении субстанции одновременно с введением бараньих эритроцитов количество АОК не отличалась от контрольных значений. Взаимодействие доза-эффект, определенное для субстанции давал значимый сходный иммунологический эффект. Максимальный эффект наблюдался при концентрации субстанции в дозе 10 мг/кг. Не получено статистически значимых различий реакций при сравнении доз 40 и 20 мг/кг. Т.о., максимальный иммунологический эффект составляет 95,1-114,8%. Результаты морфологического изучения иммунотоксического действия гликозил-НММ-1 на иммунокомпетентные органы показали, что субстанция не вызывает стимуляцию роста лимфоидно-клеточных элементов. Выявленные изменения, свидетельствуют о функциональном напряжении органов. Следовательно, гликозил-НММ-1 не вызывает нарушение функционирования основных звеньев иммунной системы и не влияет на иммунный статус подопытных животных. Циклофосфамид влияет на клеточный иммунитет, обладая иммунотоксичностью. В микроструктуре тимуса вызывает отклонения от нормы, оказывает иммунотоксическое действие на его функции. Обнаруживаются обратимые атрофические изменения, которые свидетельствуют о снижении функционального напряжения органа, с повреждением структурных элементов. В структуре селезенки, лимфатических узлов (брыжеечные): корковые вещества изменены, количество и размеры лимфоидных фолликулов уменьшены, отмечается торможение накопления клеточных элементов в рыхлой соединительной ткани, уменьшение числа, размеров и активности перитонеальных макрофагов.

Проведено исследование возможного канцерогенного действия гликозил-НММ-1 и циклофосфамида в течение 24-х месяцев, наблюдение за животными проводилось до их естественной гибели. Изучаемые дозы субстанции и циклофосфамида вводились животным в течение 50 дней. В I серии опыта у мышей каждые 2-4 недели регистрировалась масса тела. Методом пальпации определялось наличие опухолевидных образований. В течение наблюдения у 6-и мышей были обнаружены опухолевидные образования: у 2-х мышей - из (контроль 1) и IV опытной группы, получавшей субстанции; и у 4-х мышей, которым вводился циклофосфамид: у 2-х мышей - из VI опытной группы, у 2-х - из VII-VIII групп. У всех животных забирались внутренние органы для морфологических исследований. В ходе опыта часть животных забивалась, а их органы – гистологическому исследованию. Способность гликозил-НММ-1 и

циклофосфамида индуцировать опухолевидные образования оценивалась отношением числа животных с опухолевидными образованиями к общему числу их в группе. Процент возникающих п/к опухолевидных образований у животных, показал об отсутствии канцерогенного эффекта ($3,4 \pm 0,7$; $3,5 \pm 0,6$; $2,4 \pm 0,5$; $2,3 \pm 0,4$; $2,5 \pm 1,9$ и $4,3 \pm 3,1$ против $2,2 \pm 1,0$ и $2,0 \pm 0,8$ в контроле). Проводился анализ крови у животных через 2-4 недели и в динамике.

Во II серии опыта каждый месяц определялась масса тела у крыс, которая находилась в норме, однако средние значения массы тела имели групповые различия. В течение 50 дней опыта и во все периоды наблюдения, масса тела у крыс, получавших гликозил-НММ-1, как у подопытных, так и контрольных групп, находилась в пределах нормы. При введении циклофосфамида в дозе 1,5 мг/кг у крыс VI опытной группы в течение 50 дней опыта отмечается тенденция к потере в массе ($173 \pm 4,91$ против $180 \pm 6,66$ в контроле 2), у VII опытной группы в дозе 1 мг/кг не наблюдалась утраты в массе тела ($175,5 \pm 3,7$ против $180 \pm 6,66$) и у VIII опытной группы в дозе 0,5 мг/кг не отмечалась потери в массе тела ($177,3 \pm 9,38$ против $180 \pm 6,66$ в контроле 2) по сравнению с контролем 2. В результате опыта было выявлено, отсутствие уменьшения массы тела у крыс, получавших субстанции по сравнению с циклофосфамидом.

Результаты наших исследований показали, что после введения гликозил-НММ-1 в исследуемых дозах в течение 24 месяцев наблюдения, у 2-х крыс - из группы интактного контроля и в дозе 8 мг/кг V опытной группы, при введении циклофосфамида у 3-х крыс, по одной, в дозах 1,5; 1 и 0,5 мг/кг из VI-VIII групп обнаруживались подкожные образования. Процент возникающих образований показал отсутствие канцерогенного эффекта ($2,7 \pm 0,2$ и $2,0 \pm 0,8$) и ($2,3 \pm 0,4$ и $2,5 \pm 1,9$). У крыс забирались внутренние органы для исследований. Через 2 месяца животные забивались и подвергались патологоанатомическому анализу, а их органы и ткани – гистологическому исследованию.

Изучение периферической крови через 2-4 недели и в динамике у крыс, получавших в/в субстанцию выявило, что показатели крови находились в пределах нормы. После введения гликозил-НММ-1 в дозе 12 мг/кг в течение 50 дней в периферической крови наблюдалась тенденции к незначительному снижению общего количества лейкоцитов. Уровни абсолютного количества лимфоцитов и нейтрофилов не изменялись, изначально они были в норме. При введении субстанции в дозах 6 и 3 мг/кг снижения количества эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов ($11,29 \pm 0,17$; $11,05 \pm 1,58$ и $15,36 \pm 2,2$ против $16,25 \pm 3,2$ в контроле 2) не наблюдалось по сравнению с контрольными группами. После введения циклофосфамида в дозе 1,5 мг/кг в течении 50 дней наблюдается незначительная тенденция к лейкопении ($10,29 \pm 0,17$ против $16,25 \pm 3,2$ в контроле 2). В дозах 1 и 0,5 мг/кг не вызывает лейкопению и не влияет на лейкопоз ($10,05 \pm 1,58$ и $11,36 \pm 2,2$ против $16,25 \pm 3,2$ в контроле 2).

Показатели красной крови в пределах нормы. Введение циклофосфамида в исследуемых дозах в течение 50 дней свидетельствовало об отсутствии токсического действия на организм животных. Т.о., при введении гликозил-НММ-1 в дозе 12 мг/кг наблюдалась тенденция к снижению количества лейкоцитов в периферической крови без нарушения лимфопоэза. После введения циклофосфамида в дозе 1,5 мг/кг у животных наблюдалась тенденция к лейкопении со снижением абсолютного и относительного количества лейкоцитов в крови, В дозах 1 и 0,5 мг/кг не вызывает лейкопению и не влияет на лейкопоз. Показатели красной крови в пределах нормы. Введение циклофосфамида в исследуемых дозах в течение 50 дней свидетельствовало об отсутствии токсического действия на организм животных. При вскрытии у погибших животных обнаружены доброкачественные подкожные опухолевидные образования, что свидетельствовало об отсутствии опухолевого роста, а гибель животных была связана с естественным процессом. В микроструктуре внутренних органов не выявлено различия между контрольной и опытной группами животных, что свидетельствует о нетоксичности и отсутствии у гликозил-НММ-1 канцерогенного эффекта.

Изучение мутагенной активности гликозил-НММ-1 микроядерным тестом на культуре клеток L5178Y как в условиях метаболической активации цитохромами микросомальной фракции печени крыс, так и без метаболической активации, показало об отсутствии способности гликозил-НММ-1 вызывать нарушения в хромосомном аппарате клеток.

Исследования эмбриотоксических и тератогенных свойств субстанции и циклофосфамида на крысах обоих полов показали, что, у беременных крыс определялся прирост массы тела на 1-й, 7-й, 14-й и 20-е дни (табл. 4).

Таблица 4 - Прирост массы тела крыс во время беременности при введении субстанции гликозил-НММ-1 и циклофосфамида (абс. зн. М ± м)

Группы	Доза, мг/кг	Дни беременности				
		1-7	8-14	15-20	1-14	1-20
Масса, г						
I группа контроль		13,7±0,09	33,0±0,16	32,3±0,04	47,2±0,31	80,1±0,10
II группа контроль	Физ. раст.	13,8±0,08	33,5±0,1	32,7±0,01	47,5±0,30	80,2±0,19
III гр.	24	19,4±0,19	28,9±0,07	34,7±0,07	46,3±0,16	81,7±0,40
IV гр.	12	20,3±0,09	29,7±0,06	34,9±0,15	43,3±0,12	84,9±0,19
V гр.	6	20,7±0,16	31,3±0,11	38,8±0,40	45,0±0,08	85,1±0,40
VI гр.	3	19,1±0,12	26,6±0,07*	25,2±0,03*	40,8±0,19*	74,4±0,45*
VII гр.	2	20,3±0,04	27,8±0,09	27,4±0,15	41,0±0,11	74,6±0,07
VIII гр.	1	20,5±0,16	28,0±0,11	27,6±0,47	43,3±0,13	75,8±0,09

Примечание: знаком* достоверное отличие показателя от контроля 2 при $P \leq 0,05$.

На второй неделе введения субстанции в дозе 24 мг/кг отмечалось незначительное снижение прироста массы ($28,9 \pm 0,07$ против $33,5 \pm 0,1$ в контроле), которое в последующем нивелировалось, и к концу беременности общая прибавка прироста массы незначительно превышала ($81,7 \pm 0,06$ против $80,2 \pm 0,40$ в контроле) контрольное значение. В дозах 12 и 6 мг/кг на второй неделе введения снижения прироста массы не отмечалось ($46,3 \pm 0,13$ и $43,3 \pm 0,12$ против $47,5 \pm 0,30$ в контроле), к концу беременности общая прибавка прироста массы незначительно превышала ($84,9 \pm 0,19$ и $85,1 \pm 0,40$ против $80,2 \pm 0,23$ в контроле). Циклофосфамид в дозе 3 мг/кг на 2-3-й неделе ($26,6 \pm 0,07$ и $25,2 \pm 0,03$ против $33,5 \pm 0,1$ и $32,7 \pm 0,01$ в контроле при $P \leq 0,05$), к концу первой ($40,8 \pm 0,19$ против $47,5 \pm 0,30$ в контроле) и второй половины беременности ($74,6 \pm 0,07$ против $80,2 \pm 0,19$ в контроле при $P \leq 0,05$) приводит к потере прироста в массе тела и может оказать эмбриотоксическое действие. В дозах 2 и 1 мг/кг в первую ($41,0 \pm 0,11$ и $43,3 \pm 0,13$ против $47,5 \pm 0,30$) и к концу второй ($74,6 \pm 0,07$ и $75,8 \pm 0,09$ против $80,2 \pm 0,19$ в контроле) половины беременности приводит к незначительной потере прироста массы тела. Т.о., гликозил-НММ-1 в дозе 24 мг/кг не вызывает снижения прироста массы тела у беременных крыс, а циклофосфамид в дозе 3 мг/кг на 2-3-й неделе, в первой и к концу второй половине беременности приводит к потере прироста массы тела.

Проведено морфологическое изучение развития плодов под влиянием гликозил-НММ-1 и циклофосфамида на тотальных серийных срезах по методу Вильсона в модификации А.П. Дыбана. При введении субстанции в дозе 24 мг/кг в 2-х случаях наблюдалось уменьшение размеров одной из почек. Серийные поперечные срезы наружных и внутренних органов плодов (носовые ходы, органы ротовой полости) (III серия, опыт 3-5) и (I-III серия, опыт 6-8) топографически и структурно развиты, аномалий развития скелета, конечностей, точки окостенения в костях по распределению и размерам соответствуют норме. При подсчете количества желтых тел, мест имплантации, линейных размеров и массы плодов под влиянием субстанции и циклофосфамида не выявлено достоверных различий. Установлено, что гликозил-НММ-1 не обладает эмбриотоксическим и тератогенным действием, а циклофосфамид в дозе 3 мг/кг на 2-3-й неделе, в первой и к концу второй половины беременности приводит к потере прироста массы тела животных.

Изучение фармакокинетики гликозил-НММ-1, при сравнении фармакокинетических параметров, установленных в условиях нашего эксперимента относительно гликозил-НММ-1, с фармакокинетическими характеристиками собственно НМ позволяет констатировать однотипность фармакокинетики. Известно, что для НАМ (НММ, араноза и др.) характерно быстрое исчезновение из крови [Эммануэль Н.М. и др., 1978] (рис. 8).

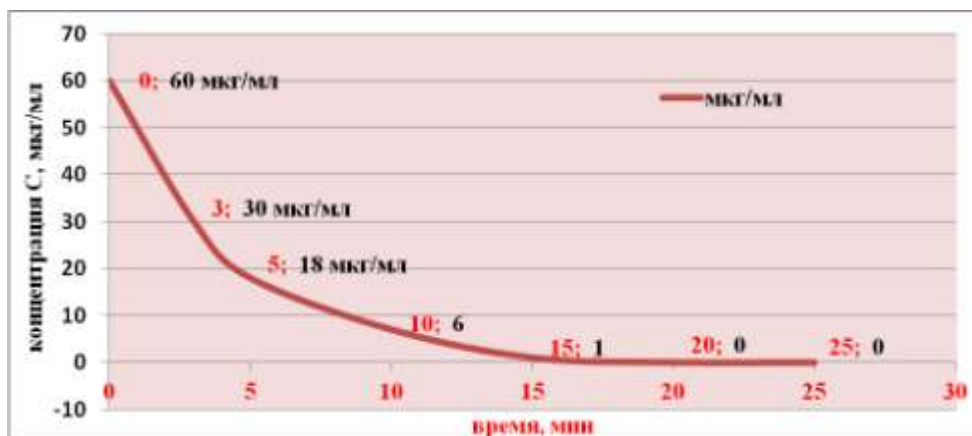


Рис. 8. Фармакокинетическая кривая «концентрация – время» гликозил-НММ-1 в сыворотке крови крыс после внутривенного введения 6 мг/кг.

Результаты изучения содержания гликозил-НММ-1 в кровотоке показали, что через 15 минут в плазме крови определяются следы, которые быстро исчезают из кровотока. Гликозил-НММ-1 близка к производным НАМ по продолжительности циркуляции в крови, которая у циклофосфида равна 6 часам, и свидетельствует о слабой обратимости его токсического действия. Циклофосфамид после введения через 5 минут обнаруживался в крови. Через 15 минут в течение часа максимальная концентрация отмечается в крови, через 1,5 часа - в моче, через 2 часа – 50 % в крови. Продолжительность циркуляции в крови равна 6 часам, а через 24 часа не определяется. В течение 6-8 часов выделяется с мочой, через 24 часа определяются его следы. Известно, что циклофосфамид после введения через 5 минут на фоне низкого содержания в почках, высокая концентрация обнаруживается в органах: в легких, печени, опухоли и др.. Основная часть выводится почками, через 1,5 часа в моче обнаруживаются продукты биотрансформации и активный препарат. А производные НАМ (НММ, араноза) быстро исчезают из крови [Эммануэль Н. М., 1978; Проценко Л.Д., 1985; Мирошниченко И.И., 1994]. Т.о., изучение фармакологических свойств гликозил-НММ-1 показало, что не обладает местно-раздражающим, кожно-резорбтивным, алергогенным, кумулирующим действием, иммунодепрессивным, канцерогенным, мутагенным, эмбриотоксическим и тератогенным действием. После введения гликозил-НММ-1 быстро исчезает из кровотока, продолжительность циркуляции в крови составляет 15 минут. Субстанция близка к другим производным НАМ по продолжительности циркуляции в крови, которая у циклофосфида равна 6 часам.

В VII главе «Способ лечения АОЭ (диплоидный вариант) гликозил-НММ-1» приводятся результаты применения субстанции при асцитной и п/к опухоли на опухоленосителях в сравнении с циклофосфамидом. С целью лечения асцитной опухоли гликозил-НММ-1 вводился в дозах: 100 мг/кг 1 раз; 50 мг/кг 2 раза; 30 мг/кг 3 раза и 9 мг/кг ежедневно в течение 10 дней;

циклофосфамид в дозах: 20 мг/кг 1 раз; 15 мг/кг 2 раза; 10 мг/кг 3 раза и 5 мг/кг ежедневно в течение 10 дней (рис. 9).

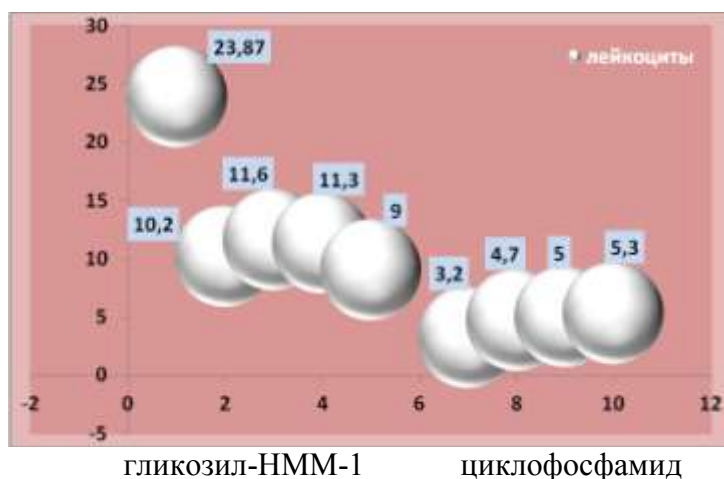


Рис. 9. Содержание лейкоцитов в крови у опухоленосителей при асцитном варианте АОЭ при введении гликозил-НММ-1 и циклофосфамида ($P \leq 0,05$).

Результаты исследования показали, что гликозил-НММ-1 при асцитной опухоли способствует снижению количества лейкоцитов в крови до нормы, уменьшается масса тела и объем опухоли, ПО эффект составляет 93%. При применении циклофосфамида наблюдается выраженное снижение количества лейкоцитов в крови, угнетение относительного и абсолютного количества лимфоцитов, нестойкое угнетение гемопоэза, снижение массы тела и объема опухоли, ТРО составляет 47 %. При цитологическом исследовании обнаружены мезотелиальные клетки с апоптозом, клетки находились в состоянии лизиса с образованием клеток-«теней». На фоне лечения с гликозил-НММ-1 дозах опухолевые клетки заметно уменьшились. Циклофосфамид в исследуемых дозах незначительно уменьшает опухолевые клетки.

Гликозил-НММ-1 при лечении п/к варианта АОЭ уменьшает массу опухоли СПЖ увеличивается в 5 раз (81 %), УПЖ – 7 раз (175 дней), ТРО - 97%. При применении циклофосфамида масса п/к опухоли уменьшалась, ТРО составило 47 %, СПЖ - 45 дней, УПЖ - 45 дней, т.е. в 7 раз меньше, чем у гликозил-НММ-1 (рис. 10).

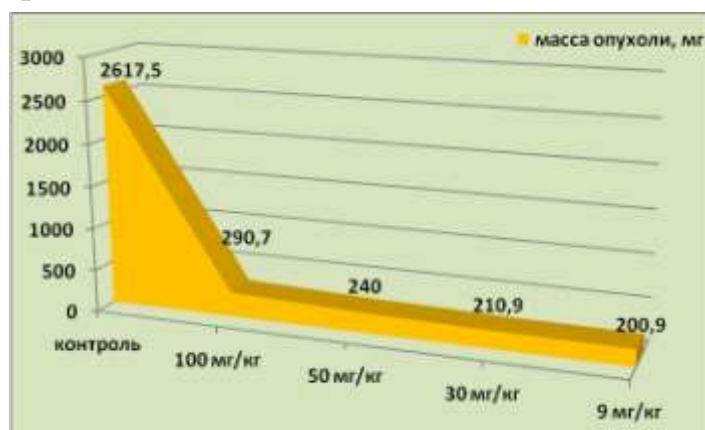


Рис. 10. Влияние субстанции гликозил-НММ-1 на массу опухоли при подкожном варианте АОЭ на 21-й день опыта ($P \leq 0,05$).

Патоморфологические исследования показали, что в структуре органов наблюдается повреждение опухоли, многоядерные клетки и очаги некроза. В клетках происходят выраженные дегенеративные изменения, приводящие их к гибели и лизису. При лечении опухоленосителей гликозил-НММ-1 и циклофосфамид соответствуют критериям ПО действия в первичном скрининге по отбору ПО средств.

Т.о., на нынешнем этапе ХТО оформилась как перспективный метод общего воздействия на опухоль. В профилактической ХТ последнего поколения назначаются комбинации производных НАМ для полного блокирования ЗНО и снятия болевых синдромов при метастазах. Положительные результаты получены по разработке эффективных способов ХТ в сочетании с другими видами лечения, нацеленными на излечение или продления жизни больного. Создание более новых эффективных и безопасных ПО препаратов основывается на проведении физико-химических, фармацевтических, фармакологических, морфологических и клинических исследований. В развитии методов лечения ЗНО важную роль играет исследование ХТ средств для внедрения в клиническую практику, в частности, гликозил-НММ-1, с целью создания ПО препарата с выраженной ПОА.

Учитывая вышеизложенное, можно заключить, что проведенные нами исследования по разработке нового ПО средства и изучения физико-химических свойств субстанции гликозил-НММ-1 ее токсикологические характеристики в сравнении с циклофосфамидом, анатомо-морфологические исследования внутренних органов и тканей, специфическая ПОА на АОЭ (диплоидный вариант), фармакологические свойства, а также способы лечения АОЭ с ее применением имеют важное значение в создании нового ПО препарата с выраженной ПОА для лечения ЗНО.

ВЫВОДЫ

1. Физико-химические свойства субстанции гликозил-НММ-1 соответствуют требованиям ГФ XI и XIII изд. для сухих лекарственных веществ, предназначенных для парентерального введения. Субстанцию получают простым методом синтеза, хорошо растворима в воде.
2. ЛД₅₀ гликозил-НММ-1 при однократном в/б и в/в введениях животным равняется 1950 и 717 мг/кг, соответственно, т.е. малотоксичен и по степени токсичности относится к IV классу. При микроскопическом исследовании органов патологий не выявлено. ЛД₅₀ циклофосфамида равняется 100 мг/кг.
3. В условиях хронического опыта гликозил-НММ-1 не вызывает потерю массы тела, повышения ректальной температуры, не изменяет функции ССС и органов дыхания. В дозе 65 мг/кг вызывает тенденцию к незначительной лейкопении, не угнетает лейкопоз, не нарушает обмен веществ: количество

общего белка, уровень липидов, β -липопротеидов сыворотки крови; не влияет на клеточные элементы костного мозга, функции печени, почек и ЦНС; в микроструктуре желудка наблюдаются дегенеративно-дистрофические изменения слизистой оболочки; дегенерация эпителия канальцев почек, серозное воспаление, набухание стенок артериол.

4. Специфическая ПОА гликозил-НММ-1 при асцитном варианте АОЭ: уменьшает массу тела у опухоленосителей, массу и объем опухоли, снижает лейкоциты крови до нормы, ПОА - 93 %; При цитологическом анализе клеточный состав опухоли количественно уменьшился. Обнаружены единичные мезотелиальные клетки с признаками апоптоза и лизиса с образованием клеток-«теней». При подкожном варианте АОЭ: полностью уменьшает массу и объем опухоли, лейкоциты крови до нормы, СПЖ увеличивается в 5 раз, УПЖ – 7 раз (175 дней), ТРО - 97 %. В микроструктуре выявляются признаки повреждения опухолевой ткани: многоядерные клетки, очаги некроза, гибель и лизис клеток.
5. Гликозил-НММ-1 не обладает местно-раздражающим, кожно-резорбтивным, аллергогенным, иммунодепрессивным, кумулятивным, канцерогенным, мутагенным, эмбриотоксическим и тератогенным действием. Циклофосфамиду характерна высокая кумулирующая способность и иммунодепрессивное действие.
6. Изучением фармакокинетики гликозил-НММ-1 в кровотоке установлено, что после введения через 15 минут в крови определяются следы, которые быстро исчезают из кровотока, гликозил-НММ-1 близок к другим НАМ (НМ, НММ, араноза и др.) по продолжительности циркуляции в крови. А время циркуляции циклофосфамида в кровотоке - до 6 часов.
7. Способ лечения с гликозил-НММ-1 АОЭ асцитного и подкожного вариантов у опухоленосителей показал, что субстанция обладает выраженным ПО действием, превосходящим по активности препарат сравнения. Преимуществами гликозил-НММ-1 являются высокая ПОА при АОЭ - 93 и 97%, УПЖ - 175 дней, не вызывает лейкопению, обладает избирательными свойствами и проникающей способностью через ГЭБ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Субстанция гликозил-НММ-1 может оказаться эффективным средством для лечения онкологических заболеваний (лейкозы, лейкемии, АОЭ (диплоидный вариант) и др.). Гликозил-НММ-1 может рекомендоваться после экспертной оценки доклинических данных, к клиническим исследованиям в качестве ПО средства после рассмотрения ДЛО и МТ МЗ КР.
2. В экспериментальных исследованиях с целью лечения АОЭ (диплоидный вариант) гликозил-НММ-1 рекомендуется в дозах: 100 мг/кг 1 раз, 50 мг/кг 2

раза, 30 мг/кг 3 раза и 9 мг/кг ежедневно в течение 10 дней (Патент КР № 1129). Используется в учебном процессе и экспериментальных исследованиях по разработке ПО средств.

3. Гликозил-НММ-1 может стать перспективным противоопухолевым лекарственным препаратом, после проведения необходимых этапов клинических исследований.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **Камчибекова, Ч.** Технология производства и аналитический контроль препарата АДЭКО / [Ж.А. Джаманбаев, З.А. Джаманбаева, В.А. Афанасьев, Ч. Камчибекова и др.] // Прир. сырье. Физиол. актив. соед.: сб. науч. тр. - ИХХТ НАН КР. Бишкек, Илим, 1996. - Ч. 3.- с. 59-61.
2. **Камчибекова, Ч.** Production technology and analitikal control of preparation ADEKO /J.A. Djamanbaev, Z.A. Djamanbaeva, V.A. Afanasiev, Ch. Kamchibekova et al.] // Abstr. collect. of transact. Nat. Academy of scien. of Kyrgyz Repub. Inst. of chem. and chemic. technol.: Abstr. - Bichkek, Ilim, 1997. - p. 40.
3. **Камчибекова, Ч.** УФ-спектры поглощения гликозилнитрозометилмочевин / Ж.А. Джаманбаев, З.А. Джаманбаева, Ч. Камчибекова и др. // Орг. синт. и выдел. орган. вещ. из прир. сырья. Устан. строен. и оцен. реакц. спос. получ. соед.: сб. науч. тр. - ИХХТ НАН КР, Бишкек, Илим, 1998. - Ч. 3. - с. 24-26.
4. **Камчибекова, Ч.** Медико-фармакологические предпосылки создания новых противоопухолевых. препаратов класса нитрозоалкилмочевин / [Ж.А. Джаманбаев, А.З. Зурдинов, Р.А. Абдылдаев, Ч. Камчибекова и др.] // Центр.-Азиат. мед. журн. - 1999. - Т. 5. - № 6. - с. 422-424.
5. **Камчибекова, Ч.** Сравнительное изучение острой токсичности гликозил-семикарбазид-нитрофурфуролов / Ч. Камчибекова, Ж.А. Джаманбаев, А.З. Зурдинов // Пробл. и персп. разв. хим. и химич. техн. в Кыргызстане: сб. науч. тр. - НАН КР, ИХХТ НАН КР. Бишкек, Илим, 2001. - с. 209-212.
6. **Камчибекова, Ч.** Экологическая роль N-гликозидов в разработке противоопухолевых препаратов / Ч. Камчибекова, З.Б. Бузурманкулова, Л.И. Атарская // Вестн. КГУ им. И. Арабаева. Матер. межд. науч. конф. «Экол. безоп. горных стран и новые информ. технол. в образов.», посв. «Году гор» и 50-лет. КГУ им. И. Арабаева. МО и К КР, Организ. по безоп. и сотр. в Европе, Инст. экол. и прир. польз. при КГУ им. И. Арабаева. - Бишкек, 2002. - В. 2. - с. 199-202.
7. **Камчибекова, Ч.** Изучение нейродинамической активности гликозил-НММ-1 на подопытных животных / Ч. Камчибекова, А.З. Зурдинов, Л.И. Атарская // Изв. ОшГУ. Экол. и природ. ресурсы Тянь-Шаня. ОшГУ. - Ош, 2002. - Ч. 1. - с. 304-307.

8. **Камчибекова, Ч.** Определение биологической активности соединения гидразин-4 (N-β-D-ксилопиранозил) семикарбазида в опытах на разных животных / Ч. Камчибекова, Ж.А. Джаманбаев // Вестн. КНУ. Матер. респ. науч.-практ. конф., посв. Году Госуд. КР и 70-лет. фак. биол. КНУ им. Ж. Баласагына. Центр магистратуры, аспирантуры и национальных образовательных программ. Бишкек, 2003. - Сер. 5. - Т. 2. - с. 166-168.
9. **Камчибекова, Ч.** Экспериментальное изучение противоопухолевой активности соединения гликозил-НММ-1 / [Ч. Камчибекова, Л.И. Атарская, А.З. Зурдинов и др.] // Актуальные вопросы современной гистопатологии, посв. 80-лет. со дня рожд. Засл. деят. организ. здравоохран. КР Акылбекова К. М. (ноябрь): сб. науч. тр. - МЗ КР, КГМА, Бишкек, 2003. - с. 29-34.
10. **Камчибекова, Ч.** Количественное определение соединения гликозил-НММ-1 / [Ч. Камчибекова, Ж.А. Джаманбаев, А.З. Зурдинов и др.] // Матер. I съезда фармацевтов КР, посв. 2200-лет. Кырг. госуд. МЗ КР, ДЛО и МТ. Бишкек, 2003. - с. 164-168.
11. **Камчибекова, Ч.** УФ-спектры поглощения соединения гликозил-НММ-1 / [Ч. Камчибекова, Ж.А. Джаманбаев, А.З. Зурдинов и др.] // Матер. I съезда фармац. КР, посв. 2200-лет. Кырг. госуд. МЗ КР, ДЛО и МТ. Бишкек, 2003. - с. 159-162.
12. **Камчибекова, Ч.** Медико-фармакологические основы разработки и методов синтеза углеводных производных нитрозомочевины (доклад, слайды) / Ч. Камчибекова, А.З. Зурдинов, Ж.А. Джаманбаев // Матер. конф., посв. 10-лет. образов. мед. фак. КРСУ. Физиол., морф. и патол. человека и животн. в клим.-геогр. условиях Кыргызст. КРСУ. Бишкек, 2004. - В. 4. - с. 64-69.
13. **Камчибекова, Ч.** Разработка методов синтеза эффективных противоопухолевых препаратов / Ч. Камчибекова // Вестник ОГУ. Экспериментальная биология и медицина. Оренбург, 2005. - № 12. - с. 76-80.
14. **Kamchibekova, Ch.** Pharmacological premises of the creation of a new antitumoral preparations of the class of nitrozoalkylurea (article) / [J.A. Djamanbaev, Ch. Kamchibekova, J.A. Abdurashitova et al.] // J. Oxidation Communications. Bulgarian-English academic Publishing House; 2008. - V. 31. - № 4. - p. 891-894.
15. **Камчибекова, Ч.** Медико-фармакологические предпосылки разработки противоопухолевой субстанции КДЗ / Ч. Камчибекова, А.З. Зурдинов // Фармация Казахстана. МЗ РК. РГП "НЦЭЛС, ИМН и МТ". Алматы, 2008. - № 6 (85). - с. 30-32.
16. **Камчибекова, Ч.** Способ лечения асцитной опухоли Эрлиха / [Ч. Камчибекова, Ж.А. Джаманбаев, А.З. Зурдинов и др.] // Журн. интелл. собств. Офиц. бюлл. КП КР. Бишкек, 2009. - № 1. - с. 6-7.
17. **Камчибекова, Ч.** Создание лекарственных средств «Карагай» и «КДЗ» из природных и синтетических сырьевых источников / Ч. Камчибекова //

Матер. межд. науч.-практ. конф., посв. 80-лет. акад. НАН КР, д.м.н., проф. А.А. Алтымышева. Акт. пробл. сохр. и рац. исп. биол. ресурс. - как осн. разв. фармац. пром. КР. ИЦФ НАН КР. Бишкек, Илим, 2010. - с. 61-64.

18. **Kamchibekova, Ch.** Pharmacological premises of the creation of new antitumor preparations of the class of nitrosoalkylurea / [J.A. Djamanbaev, Ch. Kamchibekova, J.A. Abdrashitova et al.] // Environmental Science, Engineering & Technology Series. Health, Cultural Heritage & Environmental Protection. Advanced Biologically. Active Polyfunctional Compounds and Composites. Nova Science Publishers, Inc. USA, New York, 2010, 17, p. 201-205.
19. **Kamchibekova, Ch.** Creation of medical products of Karagai and KDZ from natural and synthetic raw sources, and their pharmacological properties / Ch. Kamchibekova // Изв. НАН КР. Бишкек, Илим, 2012. - № 4. - p. 106-108.
20. **Kamchibekova, Ch.** Development of methods of synthesis and study of antitumor activity of the substance Glycosil-NMM-1 / Ch. Kamchibekova // Изв. НАН КР. Бишкек, Илим, 2013. - № 1. - с. 56-60.
21. **Камчибекова, Ч.** К фармакологии новой противоопухолевой субстанции из производных нитрозоалкилмочевин / Ч. Камчибекова // Моногр. - Бишкек, Maxprint, 2014. – 110 с.
22. **Камчибекова, Ч.** Создание нового противоопухолевого лекарственного препарата КДЗ / Ч. Камчибекова // Матер. межд. науч. конф. посв. 85-лет. акад. А.А. Алтымышева. ИЦФ НАН КР. Бишкек, Илим, 2015.- с. 69-74.
23. **Камчибекова, Ч.** Изучение физико-химических и аналитических свойств субстанции КДЗ / Ч. Камчибекова // Журн. Universum: медицина и фармакология. - Москва, 2016. - № 4 (26). - 5 с.
24. **Камчибекова, Ч.** Изучение острой токсичности субстанции КДЗ в сравнении с циклофосфамидом / Ч. Камчибекова // Журн. Universum: медицина и фармакология. - Москва, 2016. - № 4 (26). - 4 с.
25. **Камчибекова, Ч.** Анатомо-морфологическое исследование внутренних органов и тканей экспериментальных животных при изучении острой токсичности субстанции КДЗ / Ч. Камчибекова // Журн. Universum: медицина и фармакология. - Москва, 2016. - № 4 (26). - 4 с.
26. **Камчибекова, Ч.** Морфологическое исследование внутренних органов и тканей животных под влиянием субстанции КДЗ в условиях хронической токсичности / Ч. Камчибекова // Журн. Universum: медицина и фармакология. - Москва, 2016. - 5(27). - 6 с.
27. **Камчибекова, Ч.** Изучение некоторых показателей хронической токсичности субстанции КДЗ / Ч. Камчибекова // Журн. Universum: медицина и фармакология. - Москва, 2016. - № 7 (29). - 10 с.
28. Патент КР на изобретение. № 1129. Способ лечения асцитной опухоли Эрлиха / [Ч. Камчибекова, Ж.А. Джаманбаев, А.З. Зурдинов и др.]. - Бишкек, КП КР, 2008.

**Ч. Камчибекованын 14.03.06 – фармакология, клиникалык фармакология адистиги боюнча медицина илимдеринин доктору илимий даражасына талапкерликке «Ракка каршы жаңы гликозил-нитрозометилмочевина-1 дарысын түзүү» аттуу диссертациясынын
КОРУТУНДУСУ**

Негизги сөздөр: шишик ооруларына каршы гликозил-НММ-1 субстанциясы, фармакологиялык касиеттери, циклофосфамид дарысы менен салыштыруу.

Изилдөөнүн объектиси: гликозил-НММ-1 субстанциясы, салыштыруучу дары - циклофосфамид, тажрыйбадагы жаныбарлар, 2 варианттуу Асцит шишиги бар оорулуу жаныбарлар.

Изилдөөнүн предмети: гликозил-НММ-1 субстанциясынын фармакологиялык касиетин жана өзгөчө шишикке каршы активдүүлүгүн изилдөө.

Изилдөөнүн максаты: жаңы ракка каршы терс таасири төмөн субстанция гликозил-НММ-1ди жасоо жана клиникага чейинки фармакологиясын, терс таасирин илимий изилдеп негиздөө.

Изилдөөнүн ыкмалары: жалпы тарыхый, илимий, көркөм колдонуу, Power Point, Microsoft Office Excel программалары, өткөн жана азыркы учурду камтыган фармакологиялык-токсикологиялык, лаборатордук клиникалык, биохимиялык тескеп-териштирүү, биохимиялык, иммунологиялык, эксперименталдык, анатомиялык-морфологиялык, цитологиялык, фармакокинетикалык, статистикалык ыкмалар.

Натыйжалары жана алардын жанылыгы: шишик ооруларына каршы эң таасирдүү гликозил-НММ-1 субстанциясы иштелип чыкты.

Биринчи жолу физикалык, химиялык, клиникага чейинки изилдөөлөр текшерилди; субстанция гликозил-НММ-1дин фармакологиялык касиети жаныбарларга изилденди; спецификалык жана спецификалык эмес терс таасиринин параметрлери табылды; фармакокинетикасы текширилди. НММдин туундуларынын ичинен терс таасири аз денгээлдеги субстанция табыды, ал жаңы рака каршы дарыны жасоодо негиз боло алат; Эрлихтин асцит шишигинин кош варианты бар жаныбарларды гликозил-НММ-1 менен дарылоо ыкмасы көрсөткөндөй, субстанция жогорку шишикке каршы активдүүлүккө ээ, жашоону 175 күнгө узартат, лейкопенияны пайда кылбайт, тандоо жана гемато-энцефалдык тоскоолдон өтүү касиетине ээ. Гликозил-НММ-1 менен “Эрлихтин асцит шишигинин дарылоо ыкмасы”на 31.12.2008 ж. № 1129 КР патенти алынган.

Чөйрөсү: саламаттыкты сактоо, базистик, клиникалык фармакологияда, онкологияда, фармацияда, химияда, биологияда, медициналык ЖОЖда.

РЕЗЮМЕ

диссертации Камчибековой Ч. «Разработка нового противоопухолевого лекарственного препарата гликозил-нитрозометилмочевина-1» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Ключевые слова: противоопухолевая субстанция гликозил-НММ-1, фармакологические свойства, сравнение с препаратом – циклофосфамид.

Объекты исследования: субстанция гликозил-НММ-1, препарат сравнения - циклофосфамид, экспериментальные животные и животные-опухоленосители с АОЭ.

Предмет исследования: изучение фармакологических свойств и специфической ПО активности субстанции гликозил-НММ-1.

Цель исследования: научное обоснование разработки новой цитостатической ПО субстанции со сниженным потенциалом токсичности в группе производных НММ и доклиническое исследование фармакологии и токсикологии оригинальной субстанции гликозил-НММ-1.

Методы исследования: общеисторический, исследовательский, графический, физико-химические, экспериментальные, фармакологические, клиничко-лабораторные, биохимические, морфологические и статистические с применением программ Microsoft Office Excel, Power Point.

Полученные результаты и их новизна: разработано высокоактивное ПО средство гликозил-НММ-1; впервые проведены физико-химические, доклинические исследования; изучены фармакологические свойства субстанции гликозил-НММ-1 на животных; установлены параметры специфической и неспецифической токсичности; исследована фармакокинетика. Среди производных НММ найдена субстанция с минимальным уровнем токсичности, которая может служить в качестве основы для создания нового ПО препарата; установлено ПО действие гликозил-НММ-1, превосходящее по активности препарат сравнения. Способ лечения АОЭ асцитного и подкожного вариантов у опухоленосителей с применением субстанции гликозил-НММ-1 показал, что субстанция обладает высокой ПОА - 93 и 97%, УПЖ - 175 дней, не вызывает лейкопению, обладает избирательными свойствами и проникающей способностью через ГЭБ, получен Патент КР на изобретение № 1129 от 31.12.2008 г. «Способ лечения АОЭ» с использованием гликозил-НММ-1.

Область применения: здравоохранение, базисная, клиническая фармакология, онкология, фармация, химия, биология, при обучении бакалавров, магистров в медицинских ВУЗах.

SUMMARY

of the Doctor of Medicine thesis by Kamchibekova Ch. “The development of a new antitumor medicine of glikozil-nitrozomethylurea-1” in a specialty 14.03.06 – pharmacology, clinical pharmacology

Keywords: antitumor substance of glycozil-NMM-1, pharmacological properties, comparison with a preparation of cyclophosphamide.

Objects of research: substance of glycozil-NMM-1; a preparation of cyclophosphamide, experimental animals with tumors.

Subject of research: study of pharmacological properties and specific antitumor activity of substance of glycozil-NMM-1.

Purpose of research: science developing of a new antitumor substance of glycozil-NMM-1 with lower potential toxicity in the group of derivatives NMM and up to clinical research of pharmacology and toxicology of origin substance of glycozil-NMM-1.

Research of methods: common hysterical, researches, graphical, application of programm Microsoft Office Excel, Power Point et al., physical, chemical, experimental, pharmacological, clinical laboratory, biochemical, morphological, statistical.

Obtained results and their novelty: It was developed highly active antitumor medical product of glycozil-NMM-1.

For the first time were lead preclinical, physical, chemical, established parameters of pharmacological activity of substance glycozil-NMM-1 on the animals and toxically parameters specific and non specific, was studied pharmacorinetical properties. Among these derivatives of NMM was open the substance glycozil-NMM-1 with minimal degree of toxicity. The original substance from grope of derivatives of NMM was based in quality of basis for the creation of a new substance preparation; was established a substance glycozil-NMM-1 with antitumor therapeutic action, wich is more active then a preparation for comparison. It was studied specific antitumor of activity on the animals with tumors of Erich (double variant) in the comparison preparation; It was established, that a substance possesses antitumor activity 93 and 97%, reduces volume of the tumor, brakes its growth and causes lengthening expectancy of a life at the animals on 175 days, is not causes leucopenia, possesses selective and penetration properties thru GEB. It was obtained the Patent of KR on invention № 1129 at 31.12.2008 «Способ лечения АОЭ» with using of the glycozil-NMM-1.

Scope: Heals, basic, clinical pharmacology, oncology, pharmacy, chemistry, biology at the studying of HMS.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОЭ	-	асцитная опухоль Эрлиха
АОК	-	антителообразующие клетки
Гликозил-НММ-1	-	гликозил-нитрозометилмочевина-1
ГЭБ	-	гематоэнцефалический барьер
ГФ РФ	-	Государственная Фармакопея Российской Федерации
ДНК	-	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛТ	-	лучевая терапия
ЖКТ	-	желудочно-кишечный тракт
НАМ	-	нитрозоалкилмочевина
НМ	-	нитрозомочевина
НММ	-	нитрозометилмочевина
ПО	-	противоопухолевый
ПОА	-	противоопухолевая активность
ССС	-	сердечно-сосудистая система
СОЭ	-	скорость оседания эритроцитов
СПЖ	-	средняя продолжительность жизни
ТРО	-	торможение роста опухоли
УПЖ	-	удлинение продолжительности жизни
ХТ	-	химиотерапия
ХТО	-	химиотерапия опухолей
ЦНС	-	центральная нервная система

Отпечатано в ОсОО «Соф Басмасы»
720020, г. Бишкек, ул. Ахунбаева 92.
Тираж 100 экз.