

ПРЕДКЛИНИЧЕСКОЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОРМУСТИНА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ У КРЫС В УСЛОВИЯХ СУБХРОНИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

В.А. Чалей, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, В.М. Бухман,
Н.Ю. Кульбачевская

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Вера Андреевна Чалей v.chaley@list.ru

Введение. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проведены доклинические токсикологические исследования лиофилизированной лекарственной формы ормустина (Ормустин) — нового противоопухолевого препарата из класса нитрозоалкилмочевин. В работе представлены результаты изучения субхронической токсичности Ормустина на крысах.

Цель исследования — изучение субхронической токсичности Ормустина на крысах при ежедневном 3-кратном внутривенном введении.

Материалы и методы. Исследование проведено на 40 неинбредных крысах-самцах. Ормустин вводили внутривенно ежедневно 3-кратно в суммарных дозах 300, 200 и 100 мг/кг. Срок наблюдения — 45 сут. На протяжении всего срока наблюдения проводили необходимые клинико-лабораторные исследования. Для изучения повреждающего действия Ормустина на органы и ткани проводили патоморфологическое исследование на 3-и и 45-е сутки наблюдения.

Результаты. Установлено, что Ормустин при многократном применении у крыс в 3 исследованных дозах обладает гемато-, нефро-, кардио- и гастроинтестинальной токсичностью. Глубина и степень повреждений, а также их обратимость зависят от величины примененной дозы Ормустина.

Выводы. На основании полученных данных определены уровни токсических доз Ормустина, а именно: суммарная доза 300 мг/кг охарактеризована как высокая токсическая доза, суммарные дозы 200 и 100 мг/кг — как низкие токсические дозы. Это позволило рекомендовать Ормустин для дальнейшего исследования.

Ключевые слова: Ормустин, производные нитрозоалкилмочевин, доклиническое исследование, токсичность, крысы

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-98-105

PRE-CLINICAL STUDY OF SUBCHRONIC TOXICITY OF ORMUSTINE ON RATS

V.A. Chaley, O.I. Konyaeva, N.P. Ermakova, I.B. Merkulova, T.V. Abramova, V.M. Bukhman, N.Yu. Kulbachevskaya

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. In N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of Russia were made preclinical toxicological studies the lyophilized dosage form of ormustine (Ormustine), a new antitumor drug from the class of nitrosoureas. The paper presents some results of study the subchronic toxicity of Ormustine on rats.

Objective. The objective of present study was to investigate the subchronic toxicity of Ormustine on rats with a daily 3 times intravenous administration.

Materials and methods. The study was performed on 40 outbred male rats. Ormustine was administered intravenously daily 3 times in total doses of 300, 200 and 100 mg/kg. The observation period was 45 days. During the observation period, the necessary clinical and laboratory tests were performed. To study the damaging effect of Ormustine to organs and tissues, a pathomorphological examination was carried out at the 3rd and 45th day of observation.

Results. It has been established that Ormustine has hemato-, nephro-, cardio- and gastrointestinal toxicity when administered repeatedly to rats in the three doses studied. The depth and extent of damage, as well as their reversibility, depend on the magnitude of the applied dose of Ormustine.

Conclusion. On the basis of the data obtained, the levels of toxic doses of Ormustin have been determined, namely: a total dose of 300 mg/kg is characterized as a high toxic dose; total doses of 200 and 100 mg/kg are characterized as low toxic doses. This results allows Ormustin to be recommended for next study.

Key words: Ormustine, derivative of nitrosoalkylurea, preclinical study, toxicity, rats

Введение

Препараты из класса нитрозоалкилмочевин (НАМ) успешно применяются для лечения обширного спектра онкологических заболеваний. Особенности механизма действия НАМ обуславливают широту их спектра действия, высокую активность в отношении ряда солидных опухолей, отсутствие перекрестной резистентности с классическими алкилирующими агентами. Однако такие свойства НАМ, как низкая избирательность действия, отсроченная и кумулятивная токсичность, ограничивают их применение. В связи с этим проводится изыскание новых, потенциально эффективных в отношении противоопухолевого действия веществ из данного класса, обладающих более избирательным действием в сочетании с меньшей токсичностью [1–4].

Основываясь на данных о том, что клетка при перерождении в злокачественную увеличивает потребление аминокислот и ее мембрана обладает большей проницаемостью для них, чем мембрана нормальной клетки, в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН разработаны оригинальные методы синтеза большой группы алкилнитрозокарбамоилпроизводных аминокислот. Особенности их строения позволяют ожидать, помимо избирательной доставки в раковые клетки, и расширения спектра противоопухолевой активности за счет возможного образования в числе продуктов биodeградации этих молекул не только алкилирующих и карбомилирующих частиц, но и производных α -аминокислот — потенциальных антиметаболитов. В числе синтезированных и прошедших отбор соединений оказалось производное из класса НАМ на основе L-орнитина, получившее название Ормустин и прошедшее далее ряд доклинических испытаний в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [2, 4–6].

В лаборатории разработки лекарственных форм создана парентеральная лекарственная форма Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг (далее — Ормустин) [7–9].

В исследованиях, проведенных в лаборатории экспериментальной химиотерапии и лаборатории комбинированной терапии опухолей, Ормустин показал высокий противоопухолевый эффект на следующих перевиваемых опухолях: лимфоцитарная лейкемия Р-388, лимфоидная лейкемия L-1210, рак шейки матки РШМ-5, меланома В-16, эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC), а также на подкожных ксенографтах меланомы человека Mel7 [10–13].

В лаборатории фармакологии и токсикологии было проведено полное доклиническое токсикологическое исследование препарата, результаты которого частично представлены в научных журналах и виде тезисов на конференциях [14–18].

Цель исследования — доклиническое изучение токсичности нового противоопухолевого препарата Ормустин на крысах. **Задача исследования** — изучение субхронической токсичности препарата Ормустин при 3-кратном ежедневном внутривенном применении у неинбредных крыс-самцов.

Материалы и методы

Исследования проводили в соответствии с российскими и международными требованиями [19–25].

Работа проведена на 40 здоровых неинбредных крысах-самцах, полученных из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все животные были здоровы. Ормустин использовали в лиофилизированной лекарственной форме, полученной из лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Препарат вводили в рекомендованной концентрации (растворитель — 5 % раствор глюкозы) внутривенно ежедневно 3-кратно в 3 дозах, рассчитанных, исходя из максимально переносимой дозы, определенной в опытах по острой токсичности на крысах при внутривенном введении: суммарные дозы 300, 200 и 100 мг/кг. День последнего введения препарата принимали за 0, фоновые показатели фиксировали за 3 дня до начала введения препарата. В каждой группе животных использовали по 10 крыс, включая контроль. Пять крыс из каждой группы выводили из эксперимента на 3-и сутки, остальные 5 — на 45-е сутки после окончания курса введения препарата. Продолжительность наблюдения за животными после 3-кратного ежедневного внутривенного введения Ормустина составила 45 сут.

Критериями оценки субхронической токсичности были: число павших животных и сроки их гибели; клиническая картина интоксикации; поведенческие реакции; динамика массы тела животных; данные клинко-лабораторных исследований (клинический анализ крови, биохимический анализ сыворотки крови, суточный диурез, анализ мочи, микроскопия осадка мочи, электрокардиография — ЭКГ); данные аутопсии павших и выведенных из эксперимента животных с макроскопической и гистологической оценками.

При исследовании субхронической токсичности на крысах устанавливали уровни токсических доз, а именно:

- а) дозы, вызывающие значительные токсические изменения в органах и тканях, — высокие токсические дозы;
- б) вызывающие слабые незначительные изменения — низкие токсические дозы;
- в) не вызывающие нарушений в органах и тканях — высокие нетоксические дозы.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Office Excel и BioStat Professional по критерию *t* Фишера–Стьюдента. Различия определяли как достоверные при $p \leq 0,05$. Рассчитывали параметры, обычно используемые в токсикологии.

Результаты

Ормустин во всех изученных дозах не вызывал гибели животных, не оказывал влияния на общее состояние животных, не изменял их поведенческие реакции. На протяжении всего срока наблюдения отмечались такие проявления токсического действия препарата, как алоpecia, диарея, снижение массы тела и дальнейшее отставание в ее приросте, лейкоцитоз и тромбоцитопения. Степень описанных изменений и скорость их обратимости зависели от величины примененной дозы Ормустина [15].

У крыс, получивших Ормустин в суммарных дозах 300 и 200 мг/кг, биохимическое исследование сыворотки крови в сравнении с показателями животных контрольной группы выявило на 3-и сутки наблюдения дозозависимое снижение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ), обратимое к концу наблюдения, и увеличение содержания мочевины, к концу наблюдения прогрессирующее при применении препарата в дозе 300 мг/кг и обратимое при применении в дозе 200 мг/кг. Уровень остальных исследованных биомаркеров колебался на уровне показателей контрольных крыс и в пределах физиологической нормы для данного вида животных (рис. 1–2). Ормустин, примененный в суммарной дозе 100 мг/кг, не влиял на биохимические показатели сыворотки крови крыс.

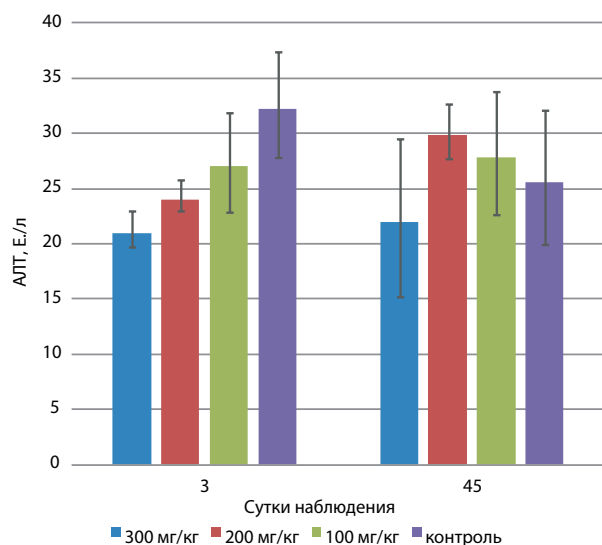


Рис. 1. Показатели АЛТ в сыворотке крови неинбредных крыс-самцов после 3-кратного внутривенного ежедневного введения Ормустина

Исследование функций сердца не выявило количественных изменений показателей временных интервалов на ЭКГ животных. Однако отмечались качественные изменения: появление патологического комплекса QS на 3-и и 30-е сутки у 2 из 5 крыс, получивших Ормустин в суммарной дозе 300 мг/кг, и нарушение сердечного ритма (желудочковая экстрасистолия) на 15-е и 30-е сутки у 2 из 5 крыс после применения препарата в суммарной дозе 100 мг/кг.

Влияния Ормустина на суточный диурез крыс не отмечено на протяжении всего срока наблюдения. В моче крыс, получивших Ормустин в суммарной дозе 300 мг/кг, на 15-е и 45-е сутки наблюдения обнаружены гиалиновые цилиндры. У животных, получивших Ормустин в суммарных дозах 200 и 100 мг/кг, на протяжении всего срока наблюдения изменений в анализе мочи не отмечено.

При аутопсии морфометрический анализ внутренних органов крыс, получивших препарат во всех дозах, выявил дозозависимое уменьшение относительной массы тимуса и селезенки на раннем сроке по сравнению с данными контрольной группы. К концу наблюдения показатели восстановились до уровня контроля, однако у крыс, получивших препарат в дозе 300 мг/кг, увеличилась относительная масса почек [15].

Патоморфологический анализ показал, что повреждающему действию препарата подвергаются лимфопролиферативные органы, почки, тонкий кишечник и сердце. Глубина и степень этих повреждений, а также их обратимость зависят от величины примененной дозы Ормустина.

Так, у всех крыс, получивших препарат в суммарной дозе 300 мг/кг, к 3-м суткам наблюдения

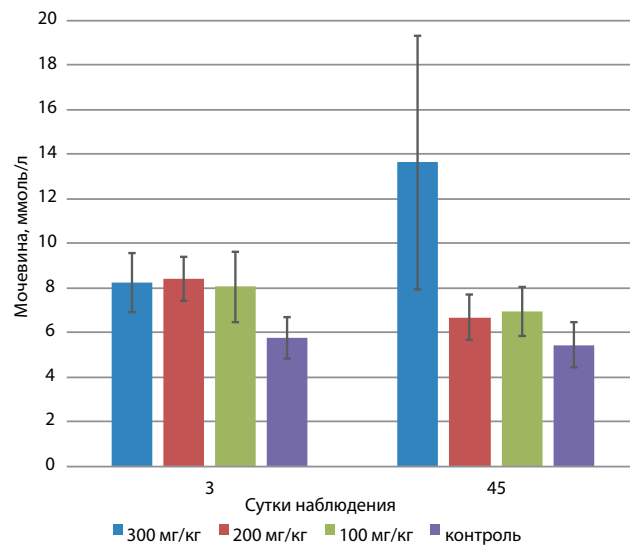


Рис. 2. Показатели мочевины в сыворотке крови неинбредных крыс-самцов после 3-кратного внутривенного ежедневного введения Ормустина

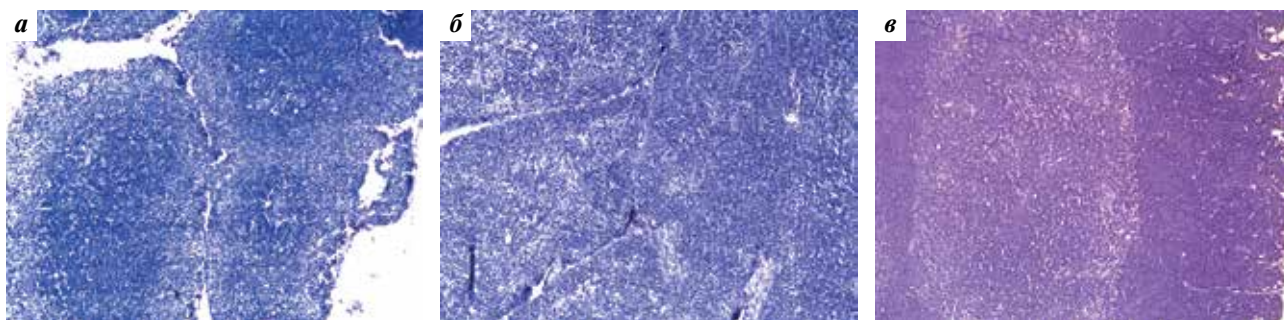


Рис. 3. Патоморфологическое исследование. Тимус крысы: а — Ормустин, 300 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Выраженная гипоплазия лимфоцитов в корковой зоне; б — Ормустин, 100 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Кортиковое и мозговое вещества без изменений. Морфологическая картина соответствует контролю; в — интактный контроль. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

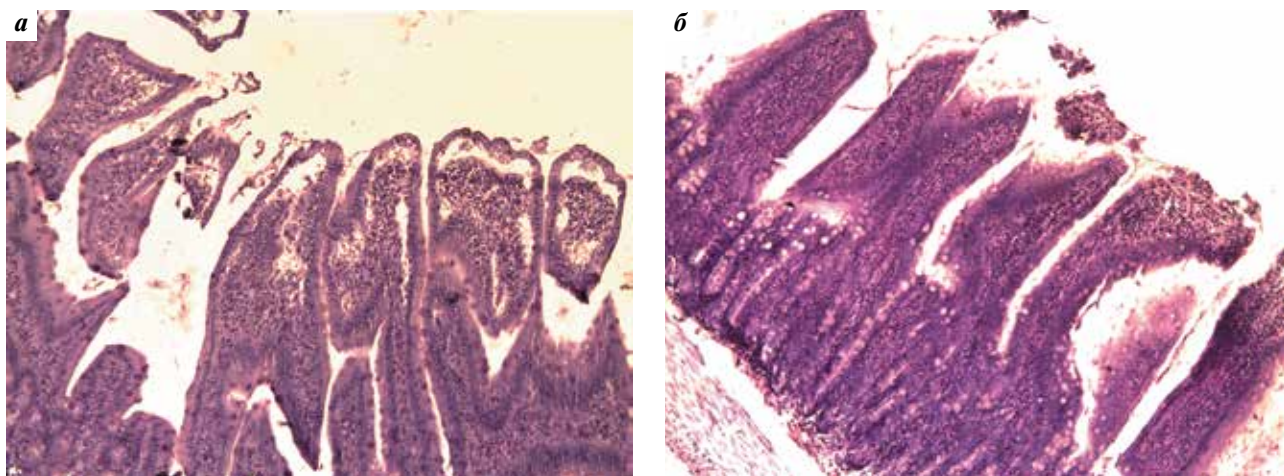


Рис. 4. Патоморфологическое исследование. Двенадцатиперстная кишка крысы: а — Ормустин, 200 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Отек и десквамация эпителия в апикальной части ворсинок. $\times 400$; б — интактный контроль. $\times 400$. Окраска гематоксилином и эозином

отмечали выраженную гипоплазию лимфоцитов в тимусе; дистрофические и деструктивные изменения в тонком кишечнике и почках — у большинства животных; гипоплазию кроветворных клеток в костном мозге и лейкоцитов в селезенке, а также участки гиперэозинофильных кардиомиоцитов (участки дистрофии и ишемии) в миокарде — у отдельных крыс. К концу наблюдения изменения сохранялись в тимусе и почках отдельных крыс. Ормустин, примененный в суммарной дозе 200 мг/кг, на раннем сроке вызывал сходные, но менее выраженные по сравнению с высокой дозой изменения в тимусе большинства крыс, в тонком кишечнике и почках отдельных крыс. К концу срока наблюдения морфологические изменения, отмеченные ранее, не выявлялись. Препарат в дозе 100 мг/кг не вызвал выраженных морфологических изменений в органах крыс как на 3-и, так и на 45-е сутки (рис. 3–7).

Оценивая в совокупности полученные данные, можно сказать, что Ормустин обладает дозозависимым гематотоксическим действием, вызывая обратимые тромбоцитопению и лейкоцитопению, про-

являющуюся снижением относительного количества лимфоцитов. Иммуносупрессивное действие препарата подтверждается морфометрически во всех дозах (уменьшение относительной массы тимуса и селезенки) и патоморфологически (гипоплазия лимфоцитов в корковом веществе в тимусе большинства крыс, в костном мозге и селезенке единичных крыс). Морфологические изменения регистрируются после применения Ормустина только в высокой и средней дозах и полностью обратимы к концу наблюдения лишь в средней дозе.

Нефротоксическое действие препарата, примененного в высокой и средней дозах, затрагивает на раннем сроке корковое вещество почек, что проявляется в виде сморщенных (спавшихся) сосудистых клубочков и деструктивных очаговых изменений извитых и прямых канальцев. На позднем сроке изменения частично выявляются и в мозговом веществе почек у крыс, получивших Ормустин в высокой дозе. Клинически это проявляется прогрессирующим возрастанием уровня мочевины в сыворотке крови, обнаружением единичных гиалиновых цилиндров

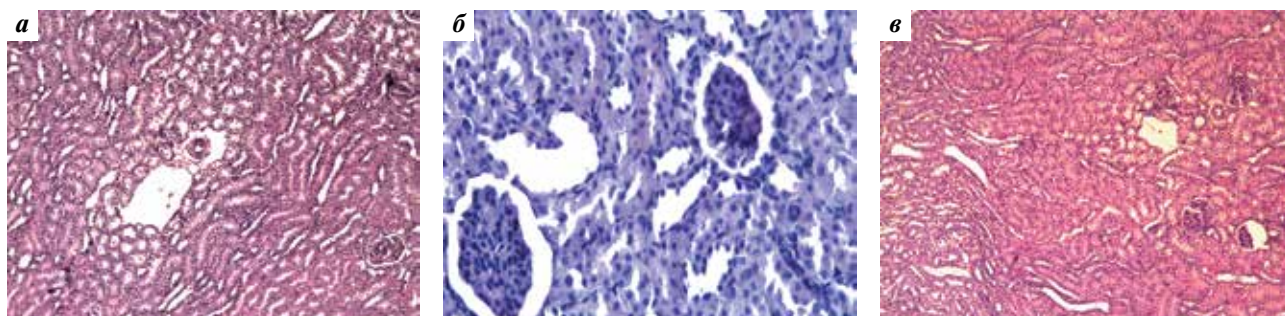


Рис. 5. Патоморфологическое исследование. Почка крысы. Кортикальное вещество: а — Ормустин, 200 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Периваскулярный отек. Участок извитых канальцев с признаками повреждения; в просвете канальцев комочки бесструктурных масс; б — Ормустин, 200 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Уплотнение и спадение сосудистых петель клубочков. $\times 400$; в — intactный контроль. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

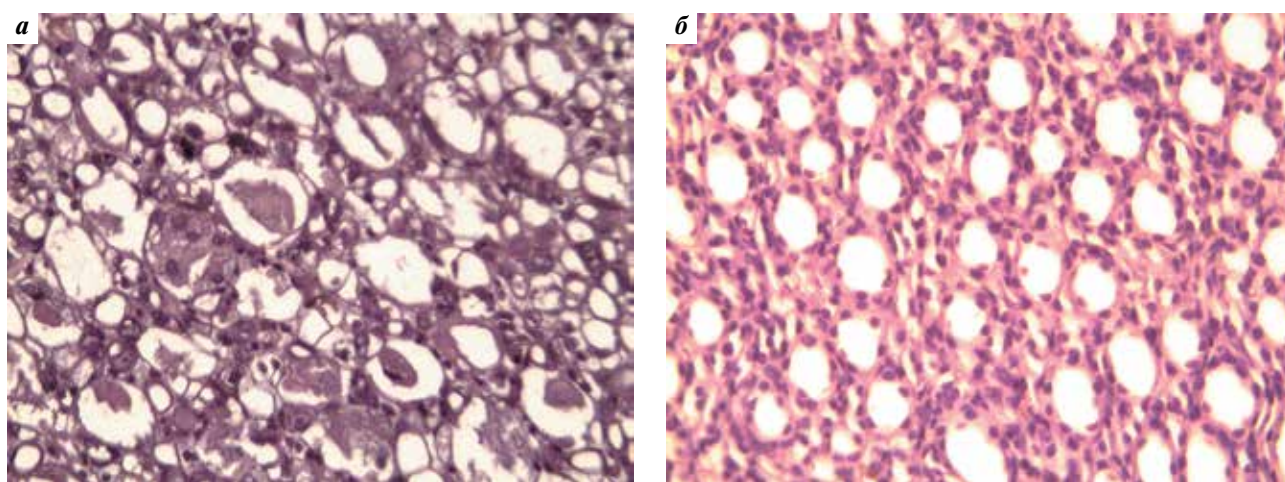


Рис. 6. Патоморфологическое исследование. Почка крысы. Мозговое вещество: а — Ормустин, 300 мг/кг, 45-е сутки наблюдения. Деструктивные изменения в мозговом веществе. В просвете прямых канальцев и собирательных трубочек десквамированный эпителий и бесструктурные массы (цилиндры); б — intactный контроль. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

в моче на 15-е и 45-е сутки наблюдения, а морфометрически — увеличением относительной массы почек.

Препарат, примененный в суммарных дозах 300 и 200 мг/кг, обладает также дозозависимой обратной гастроинтестинальной токсичностью, проявляющейся клинически снижением массы тела крыс в начале наблюдения и дальнейшим отставанием в ее приросте; диареей у некоторых крыс в начале срока наблюдения, а при патоморфологическом исследовании — десквамацией эпителия апикальной части ворсинок тонкого кишечника у отдельных крыс.

Ормустин обладает также кардиотоксическим действием. Это проявляется клинически в виде качественных изменений на ЭКГ у отдельных крыс, получивших препарат в суммарной дозе 300 мг/кг, что является результатом ишемии или метаболических нарушений миокарда, зарегистрированных морфологически в виде гиперэозинофилии кардиомиоцитов на раннем сроке (рис. 7а). Что касается нарушений сердечного ритма у некоторых крыс, получивших Ормустин в дозе 100 мг/кг, мы расцени-

ваем эти изменения как погрешность методики регистрации ЭКГ (влияние многократного эфирного наркоза) и считаем эту дозу не кардиотоксичной, так как морфологически функциональные изменения, отмеченные при применении препарата в данной дозе, не подтверждаются (см. рис. 7).

Вышеупомянутое небольшое снижение активности АЛТ в сыворотке крови крыс, получивших Ормустин в суммарных дозах 300 и 200 мг/кг, по-видимому, является на раннем сроке следствием почечной недостаточности, а на позднем сроке наблюдения — следствием снижения всасывания в тонком кишечнике пиридоксина.

Заключение

В ходе изучения субхронической токсичности Ормустина на крысах установлено, что препарат при многократном применении в суммарной дозе 300 мг/кг обладает гемато-, нефро-, гастроинтестинальной и кардиотоксичностью, причем повреждения ткани почек и тимуса обратимы не полностью

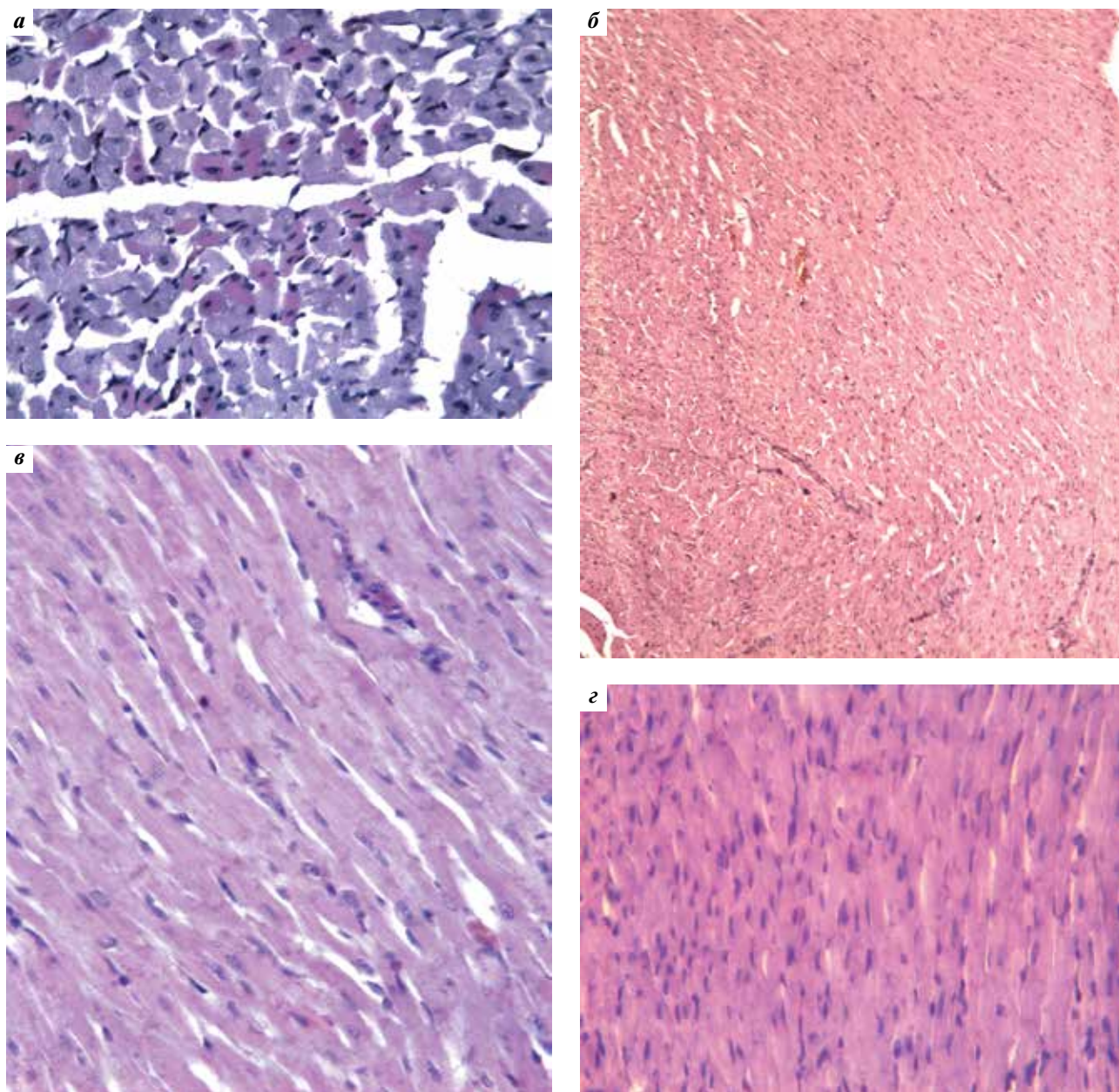


Рис. 7. Патоморфологическое исследование. Сердце крысы: а — Ормустин, 300 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Миокард левого желудочка. Поперечный срез. Отдельные кардиомиоциты с признаками набухания и гиперэозинофилии. $\times 400$; б — Ормустин, 100 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Миокард. Морфологическая картина соответствует контролю. $\times 100$; в — Ормустин, 100 мг/кг, 45-е сутки наблюдения. Миокард. Морфологическая картина соответствует контролю. $\times 400$; г — интактный контроль. Миокард. $\times 400$. Окраска гематоксилином и эозином

и через 45 сут после окончания курса введения Ормустина. В суммарной дозе 200 мг/кг препарат вызывает сходные менее выраженные по сравнению с высокой дозой и полностью обратимые функциональные и морфологические изменения, затрагивающие только почки, тимус и тонкий кишечник. В суммарной дозе 100 мг/кг препарат проявляет свои токсические свойства только в виде обратимой алопеции и уменьшения относительных масс тимуса и селезенки. Таким образом, глубина и степень повреждений внутренних органов, а также их обра-

тимность зависят от величины примененной дозы Ормустина.

На основании полученных данных определены уровни токсических доз Ормустина, а именно: суммарная доза 300 мг/кг охарактеризована как высокая токсическая доза (вызывающая значительные токсические изменения в органах и тканях); суммарные дозы 200 и 100 мг/кг — как низкие токсические дозы (вызывающие слабые незначительные изменения в органах и тканях). Полученные результаты позволили рекомендовать Ормустин для дальнейшего исследования.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Корман Д.Б. Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов. М.: Практическая медицина, 2014. С. 46–57. [Korman D.B. Targets and mechanisms of action of anticancer drugs. M.: Practical medicine, 2014. Pp. 46–57. (In Russ.)].
2. Краснов В.П., Левит Г.Л., Барышников М.А. и др. Нитрозомочевина на основе аминокислот. Оригинальный противоопухолевый препарат Лизомустин. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):46. [Krasnov V.P., Levit G.L., Baryshnikova M.A. et al. Nitrosourea on the basis of amino acids. Original anticancer drug Lisomustin. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2013;12(2):46. (In Russ.)].
3. Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. Противоопухолевые препараты, производные нитрозоалкилмочевина, применяемые для лечения новообразований различного генеза. Биофармацевтический журнал 2014;6(5):38–51. [Lantsova A.V., Sanarova E.V., Oborotova N.A. Antineoplastic preparations derivative of nitrosoalkylurea for treatment of cancer neoplastic of different genesis. Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical journal 2014;6(5):38–51. (In Russ.)].
4. Левит Г.Л. Аминокислоты в регио- и стереонаправленном синтезе физиологически активных соединений. Автореф. дис. ... докт. хим. наук. Екатеринбург, 2009. [Levit G.L. Amino acids in a regio- and stereoselective synthesis of physiologically active compounds. Abstract dis.... doc. chem. sciences. Ekaterinburg, 2009. (In Russ.)].
5. Manig F., Kuhne K., von Neubeck C. et al. The why and how of amino acid analytics in cancer diagnostics and therapy. Journal of Biotechnology 2017;242:30–54. PMID: 27932276. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.001.
6. Краснов В.П., Левит Г.Л., Матвеева Т.В. и др. Патент РФ № 2503657, 2012. Nδ-нитрозо-Nδ-[(2-хлорэтил) карбамоил]-L-орнитин. [Krasnov V.P., Levit G.L., Matveeva T.V. et al. Patent of the Russian Federation No. 2503657, 2012. Nδ-nitroso-Nδ-[(2-chloroethyl)-carbamoyl]-L-ornithine. (In Russ.)].
7. Бунятян Н.Д., Николаева Л.Л., Олефир Ю.В. и др. Валидация методики количественного определения ормустина в лиофилизированной лекарственной форме. Химико-фармацевтический журнал 2017;51(11):53–6. [Bunyatyanyan N.D., Nikolaeva L.L., Olefir Yu.V. et al. Validation of methods of quantitative determination of ormustine in a lyophilized dosage form. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Chemical-pharmaceutical journal 2017;51(11):53–6. (In Russ.)].
8. Николаева Л.Л., Ланцова А.В., Санарова Е.В. и др. Парентеральная лекарственная форма нового соединения из класса алкилнитрозомочевина. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):113. [Nikolaeva L.L., Lantsova A.V., Sanarova E.V. et al. The parenteral dosage form new connection of class nitrosoalkylurea. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2015;14(1):113. (In Russ.)].
9. Nikolaeva, L., Oborotova, N., Bunyatyan, N. et al. The development of a parenteral pharmaceutical formulation of a new class of compounds of nitrosourea. Pharmaceuticals 2016;9(4):68. PMID: 27318283. DOI: 10.3390/ph9040068.
10. Барышников М.А., Альбассит Б., Сапрыкина Н.С. и др. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитрозоалкилмочевин. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):8. [Baryshnikova M.A., Albassit B., Saprykina N.S. et al. Anticancer activity of new compounds from the class of nitrosoalkylurea. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2013;12(2):8. (In Russ.)].
11. Сапрыкина Н.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Противоопухолевая активность ормустина на перевиваемых солидных опухолях мышей. Часть I. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(4):55–60. [Saprykina N.S., Borisova L.M., Kiseleva M.P. et al. Antitumor activity of ormustine in transplantable solid tumors of mice. Part I. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2017;16(4):55–60. (In Russ.)].
12. Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Калишьян М.С. и др. Сравнительное изучение нового нитрозопроизводного ормустина с мустофораном на подкожных ксенографтах меланомы человека Mel7. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):132–3. [Smirnova G.B., Borisova Yu.A., Kalishyan M.S. et al. Comparative study of a new nitrosated derivatives ormustine with mustophoran on subcutaneous xenografts of human melanoma Mel7. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2015;14(1):132–3. (In Russ.)].
13. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Противоопухолевая эффективность ормустина, нового препарата класса алкилнитрозомочевин, в отношении перевиваемых опухолей мышей. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):133. [Smirnova Z.S., Borisova L.M., Kiseleva M.P. et al. Antitumor efficacy of ormustine, a new drug class nitrosoalkylurea, against transplantable tumors of mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2015;14(1):133. (In Russ.)].
14. Чалей В.А., Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю. и др. Изучение «острой» токсичности Ормустина на мелких лабораторных животных. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):143–4. [Chaley V.A., Konyayeva O.I., Kulbachevskaya N.Yu. et al. The study of the acute toxicity of Ormustine in small laboratory animals. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2015;14(1):143–4. (In Russ.)].
15. Чалей В.А., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Доклиническое изучение токсичности нового противоопухолевого препарата Ормустин на мелких лабораторных животных. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(4):65–72. [Chaley V.A., Konyayeva O. I., Ermakova N.P. et al. Preclinical toxicity study of a new antineoplastic drug Ormustine in small laboratory animals. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2015;14(4):65–72. (In Russ.)].
16. Ермакова Н.П., Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю. и др. Изучение алергизирующих свойств Ормустина на морских свинках. Оценка анафилактической активности. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):37–8. [Ermakova N.P., Konyayeva O.I., Kulbachevskaya N.Yu. Study of allergic properties of Ormustine on Guinea pigs. Assessment of anaphylactic activity. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. = Russian biotherapeutic journal 2016;15(1):37–8 (In Russ.)].
17. Меркулова И.Б., Абрамова Т.Б., Коняева О.И. и др. Патоморфологи-

- ческое исследование внутренних органов крыс и собак при изучении субхронической токсичности лиофилизированной лекарственной формы ормустина. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):64–5. [Merkulova I.B., Abramova T.V., Konyaeva O.I. et al. Pathomorphological examination of internal organs of rats and dogs in the subchronic toxicity study of lyophilized dosage form of ormustine. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2016;15(1):64–5. (In Russ.)].
18. Чалей В.А., Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю. и др. Доклиническое токсикологическое изучение лиофилизированной лекарственной формы Ормустина. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):115–6. [Chaley V.A., Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Yu. et al. Pre-clinical toxicological study of a lyophilized dosage form of ormustine. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2016;15(1):115–6. (In Russ.)].
 19. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986:123.
 20. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабахян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002:1–53. [Bolshakov O.P., Neznanov N.G., Babakhanyan R.V. Didactic and Ethical Aspects of Research on Biomodels and Laboratory Animals. Good clinical practice 2002:1–53. (In Russ.)].
 21. Методические указания по изучению общетоксического действия противоопухолевых фармакологических средств. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. С. 170–204. [Methodological instructions for studying the general toxic effects of antitumor drugs. In: Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Ed. by R. U. Khabriev. 2th ed., revised and additional edition. M.: Medicine, 2005. Pp. 170–204. (In Russ.)].
 22. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. С. 13–24. [A guide to preclinical drug research. Ed. by A.N. Mironov. M: Grif and Co, 2012. Pp. 13–24. (In Russ.)].
 23. Принципы надлежащей лабораторной практики. Национальный стандарт Российской Федерации (ГОСТ 53434–2009). М.: Стандартинформ, 2010. [Principles of Good Laboratory Practice. National Standard of the Russian Federation (GOST 53434–2009). Moscow: Standartinform, 2010. (In Russ.)].
 24. Об утверждении Правил лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. N 199н. [On approval of the Rules of Laboratory Practice. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation from 01 April 2016 No. 199n. (In Russ.)].
 25. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств 2-е изд., доп. М., 2008. 196 с. [Gus'kova T.A. Toxicology of medicines (second edition supplemented). Moscow, 2008. 196 p. (In Russ.)].

ORCID авторов/ORCID of authors

В.А. Чалей/V.A. Chaley: <https://orcid.org/0000-0001-7867-2868>

В.М. Бухман/V.M. Bukhman: <https://orcid.org/0000-0002-7062-798X>

Н.Ю. Кульбачевская/N.Yu. Kulbachevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4214-3475>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.