

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОРМУСТИНА НА СОБАКАХ

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

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

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

Введение. В Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина проведены доклинические токсикологические исследования ормустина — нового противоопухолевого препарата из класса нитрозоалкилмочевин. В работе представлены результаты изучения субхронической токсичности ормустина на собаках.

Цель исследования — изучение субхронической токсичности ормустина на собаках при ежедневном 3-кратном внутривенном введении.

Материалы и методы. Исследование проведено на 12 собаках породы английский бигль, самцах и самках. Ормустин вводили внутривенно ежедневно 3-кратно в суммарных дозах 1, 5, 10, 20 и 30 мг/кг. В ходе эксперимента проводили клинико-лабораторные исследования, а также патоморфологическое исследование для изучения повреждающего действия ормустина на органы и ткани.

Результаты. Ормустин в дозах 20 и 30 мг/кг вызывал гибель животных на 7-е и 8-е сутки наблюдения на фоне выраженной гемато- и гастроинтестинальной токсичности. У собак, получавших препарат во всех дозах, наблюдались внешние проявления интоксикации и изменения поведенческих реакций, снижение массы тела в течение всего срока наблюдения. Установлено, что препарат оказывает дозозависимое миелосупрессивное действие. Ормустин вызывает выраженные морфологические изменения разной степени обратимости в тонкой кишке, почках, щитовидной железе, печени, лимфатических узлах, селезенке, сердце и гонадах, менее выраженные — в толстой кишке, желудке и мочевом пузыре.

Выводы. По результатам исследования суммарные дозы ормустина 20 и 30 мг/кг охарактеризованы как летальные, 5 и 10 мг/кг — высокие токсические, 1 мг/кг — низкая токсическая доза.

Ключевые слова: ормустин, производное нитрозомочевины, доклиническое исследование, токсичность, лабораторные собаки

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-53-62

PRE-CLINICAL STUDY OF SUBCHRONIC TOXICITY OF ORMUSTINE IN DOGS

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 of the Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Introduction. In N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology were made preclinical toxicological studies of ormustine, a new antitumor drug from the class of nitrosoureas. The paper presents some results of study the subchronic toxicity of ormustine in dogs.

Objective. The objective of the present study was to investigate the subchronic toxicity of ormustine on dogs with a daily intravenous administration during 3 days.

Materials and methods. The study was performed in 12 dogs of the English beagle breed of males and females. Ormustine was administered intravenously daily during 3 days in total doses of 1, 5, 10, 20 and 30 mg/kg. During the experiment, to study the damaging effect of ormustin on organs and tissues, clinical and lab tests and pathomorphological examinations were performed.

Results. Ormustin in doses of 20 and 30 mg/kg caused the death of animals on the 7th and 8th day of observation against the background of severe hemato- and gastrointestinal toxicity. In dogs receiving the drug in all doses, there were external manifestations of intoxication and changes in behavioral reactions, weight loss during the entire observation period. It was found that the drug had a dose-related myelosuppressive effect. Ormustin caused pronounced morphological changes of varying degrees of reversibility in the small intestine, kidneys, thyroid gland, liver, lymph nodes, spleen, heart and gonads; less pronounced — in the large intestine, stomach and bladder.

Conclusion. According to the study, the total doses of ormustine 20 and 30 mg/kg were characterized as lethal, 5 and 10 mg/kg — high toxic, 1 mg/kg — low toxic dose.

Key words: ormustine, derivative of nitrosourea, preclinical study, toxicity, laboratory dogs

Введение

По данным за 2016 г., в структуре смертности населения России онкологические заболевания занимают 2-е место после болезней сердечно-сосудистой системы [1]. У детей в числе солидных злокачественных новообразований лидируют опухоли центральной нервной системы, в частности, самыми распространенными считаются глиомы [2].

В качестве химиотерапевтической составляющей лечения некоторых разновидностей рака мозга, меланомы, а также других нозологий используют препараты из группы нитрозомочевин [3–4]. Один из представителей этого класса — ормусти́н, синтезированный в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, может оказаться полезным в терапии перечисленных заболеваний [5]. В Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина разработана лекарственная форма — ормусти́н, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг [6], проведены ее доклинические исследования [7, 8]. Установлено, что препарат по сравнению с ближайшим его аналогом лизомустином в большей степени накапливается в опухолевых тканях, мозге, легких и других органах [9]. В лаборатории фармакологии и токсикологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина было проведено полное доклиническое токсикологическое исследование препарата [10, 11]. В данной статье приведены результаты заключительной части исследования — изучения субхронической токсичности ормустина на собаках.

Цель исследования — доклиническое изучение субхронической токсичности нового противоопухолевого препарата ормусти́н на собаках.

Материалы и методы

Исследования выполнены в соответствии с отечественными и международными требованиями [12, 13]. Работа проведена на здоровых собаках породы английский бигль, самцах и самках, полученных из разведения Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Ормусти́н использовали в лиофилизированной лекарственной форме, вводили в рекомендованной концентрации (растворитель — 5 % раствор глюкозы) внутривенно ежедневно 3-кратно в 3 дозы, рассчитанных, исходя из опытов по острой и субхронической токсичности на мелких лабораторных животных при пересчете на собак: суммарные дозы 10, 20 и 30 мг/кг. Однако животные оказались высокочувствительными к ормусти́ну. Две собаки после применения препарата в суммарных дозах 20 и 30 мг/кг пали на 8-е и 7-е сутки соответственно после окончания введения, в связи с чем было принято решение об элиминации доз до 1 и 5 мг/кг и постановке II этапа

эксперимента. Таким образом, в данной статье представлены обобщенные результаты изучения субхронической токсичности ормустина на 12 собаках в 5 суммарных дозах (1, 5, 10, 20 и 30 мг/кг). День последнего введения принимали за 0. Дизайн исследования представлен в табл. 1.

Критериями оценки субхронической токсичности были сроки гибели и число павших животных, поведенческие реакции, масса тела животных, клиническая картина интоксикации, данные клинико-лабораторных исследований (клинический и биохимический анализы крови, электрокардиограмма), аутопсии павших и выведенных из эксперимента животных с макроскопической и гистологической оценками.

Оценивали действие ормустина на периферическую кровь, функциональное состояние сердечно-сосудистой системы, печени, почек, желудочно-кишечного тракта. Предварительно определяли фоновые показатели, считая результаты, полученные для каждой собаки, контрольными. Полученные в ходе эксперимента данные сравнивали с контрольными значениями и нормами.

По результатам исследования субхронической токсичности на собаках устанавливали уровни токсических доз, а именно дозы, вызывающие значительные токсические изменения в органах и тканях (высокие токсические дозы), слабые незначительные изменения (низкие токсические дозы) и не вызывающие нарушений в органах и тканях (высокие нетоксические дозы).

Результаты и обсуждение

При доклинических токсикологических исследованиях ормустина установлено, что препарат, примененный в суммарных дозах 20 и 30 мг/кг, вызывал гибель животных (см. табл. 1). У собак, получивших препарат во всех дозах, были отмечены внешние проявления интоксикации и изменение поведенческих реакций на протяжении эксперимента. Так, непосредственная реакция животных на введение ормустина независимо от величины примененной дозы проявлялась состоянием оглушенности, дезориентацией и адинамией в течение 2–3 ч после инъекции. Помимо этого, у некоторых собак применение препарата в дозе 5 мг/кг вызывало дефекацию, мочеиспускание и рвотные позывы, а в дозах 10–30 мг/кг — однократную или многократную рвоту. В течение всего курса введения ормустина и 1 суток после его окончания животные не проявляли обычной активности.

У собак, получивших препарат во всех дозах, отмечали внешние признаки гастроинтестинальной токсичности: уменьшение массы тела с 3–14-х суток на 5–35 %, в дозах 10–30 мг/кг — ухудшение аппетита, сохранявшееся до конца срока наблюдения, и жидкий

Таблица 1. Дизайн исследования субхронической токсичности ормустина на собаках

Table 1. Design of ormustine subchronic toxicity study on dogs

№ группы Group №	Суммарная доза, мг/кг Total dose, mg/kg	Разовая доза, мг/кг Single dose, mg/kg	Режим и путь введения Mode and route of administration	Число животных Number of animals		
				Вскрытых на 3-и сутки наблюдения Dissected on the 3 rd day of administration	Вскрытых на 30-е сутки наблюдения Dissected on the 30 th day of administration	Вскрытых на 60-е сутки наблюдения Dissected on the 60 th day of administration
1	1,00	0,33	Внутри- венно, ежедневно в течение 3 дней Intravenously, daily for 3 days	—	2 ♀	1 ♀
2	5,00	1,67		—	2 ♀	1 ♀
3	10,00	3,30		1 ♂	1 ♀	—
4	20,00	6,70		1 ♂	1 ♀ (пала на 8-е сутки) 1 ♀ (died on the 8-th day)	—
5	30,00	10,00		1 ♀	1 ♀ (пала на 7-е сутки) 1 ♀ (died on the 7-th day)	—

Таблица 2. Динамика уровня лейкоцитов в крови собак после 3-кратного ежедневного внутривенного введения ормустина

Table 2. Dynamics of the level of leukocytes in the blood of dogs after 3-times daily intravenous administration of ormustine

Доза суммарная, мг/кг Total dose, mg/kg	№ собаки/ пол No. of dog/ sex	Сутки наблюдения Day of observation								
		Фон 1 Background 1	Фон 2 Background 2	3 3	7 7	14 14	21 21	30 30	45 45	60 60
Общее число лейкоцитов (6,0–17,0 тыс. в мм³) Total leukocytes count (6.0–17.0 thousand per mm³)										
1	1/♀	13,1	15,6	13,4	12,1	11,4	10,2	10,9	10,8	8,6
	2/♀	12,9	13,1	8,2	8,5	7,2	6,3	7,6	—	—
	3/♀	16,2	15,8	13,5	16,3	16,6	16,3	16,2	—	—
5	4/♀	8,6	9,4	5,3	4,2	3,3	8,0	9,2	—	—
	5/♀	10,1	10,5	6,5	4,3	6,8	7,6	9,3	—	—
	6/♀	10,5	13,1	7,3	4,3	6,0	6,9	13,9	11,0	12,2
10	7/♂	13,0	16,7	6,5	—	—	—	—	—	—
	8/♀	15,4	14,0	5,3	2,0	4,6	10,1	11,1	—	—
20	9/♂	11,8	12,4	1,4	—	—	—	—	—	—
	10*/♀	11,9	15,3	2,7	2,5	—	—	—	—	—
30	11/♀	7,3	10,2	2,0	—	—	—	—	—	—
	12*/♀	10,6	9,9	1,7	—	—	—	—	—	—

*Собака пала.

*The dog has died.

стул у 2 собак на 7-е сутки наблюдения. У всех самок, получивших ормустин в дозах 10–30 мг/кг, на 3-и сутки наблюдения отмечали появление серо-коричневого налета в области петли (предположительно, кандидоза, сохранявшегося до конца эксперимента).

Препарат оказывал влияние на показатели периферической крови животных во всех дозах, вызывая снижение количества лейкоцитов в основном с 3-х суток наблюдения и колебание количества тромбоцитов с 3–7-х суток наблюдения, частично или полностью

Таблица 3. Динамика уровня тромбоцитов в крови собак после 3-кратного ежедневного внутривенного введения ормустина

Table 3. Dynamics of the platelet level in the blood of dogs after 3-times daily intravenous administration of ormustine

Доза суммарная, мг/кг Total dose, mg/kg	№ собаки/ пол No. of dog/ sex	Сутки наблюдения Day of observation								
		Фон 1 Background 1	Фон 2 Background 2	3 3	7 7	14 14	21 21	30 30	45 45	60 60
Число тромбоцитов (160—525 тыс. в мм ³) Platelet count (160—525 thousand per mm ³)										
1	1/♀	480	532	512	622	624	548	556	568	486
	2/♀	415	510	149	458	428	460	430	—	—
	3/♀	351	375	367	452	476	484	500	—	—
5	4/♀	418	409	357	331	222	441	402	—	—
	5/♀	327	356	225	218	200	317	372	—	—
	6/♀	420	395	451	312	198	446	458	418	402
10	7/♂	330	445	662	—	—	—	—	—	—
	8/♀	334	379	520	313	76	219	357	—	—
20	9/♂	332	322	320	—	—	—	—	—	—
	10*/♀	414	400	473	65	—	—	—	—	—
30	11/♀	410	232	374	—	—	—	—	—	—
	12*/♀	324	332	382	—	—	—	—	—	—

*Собака пала.

*The dog has died.

обратимые в дозах 1–10 мг/кг и необратимые в дозах 20–30 мг/кг (табл. 2, 3). Снижение количества эритроцитов, гемоглобина и гематокрита было отмечено у собак, получивших ормустины в дозах ≥ 5 мг/кг, оно начиналось с 3–21-х суток наблюдения в зависимости от величины примененной дозы и было полностью обратимым лишь при 5 мг/кг. Также выявлено увеличение скорости оседания эритроцитов на 14-е сутки наблюдения у собаки, получившей препарат в дозе 10 мг/кг, и на 7-е сутки — у собаки, получившей препарат в дозе 20 мг/кг (перед гибелью).

Биохимическое исследование сыворотки крови собак, получивших ормустины во всех дозах, выявило небольшое уменьшение уровня мочевины с 3-х до 21-х суток наблюдения и колебания активности печеночных ферментов на протяжении всего срока эксперимента относительно фоновых показателей и физиологических норм (табл. 4, 5).

При изучении влияния ормустина на функции сердца установлено, что препарат, примененный в дозе 5 мг/кг, вызывал качественные изменения электрической активности сердца: появление зубца R с зубуринами (7–30-е сутки) и единичных желудочковых экстрасистол (45-е сутки наблюдения). После воздействия препарата в дозе 10 мг/кг наблюдались

только количественные изменения: уменьшение числа сердечных сокращений на 3–14-е сутки наблюдения, увеличение интервалов QT и PQ. Ормустин, примененный в дозах 20–30 мг/кг, вызывал в основном качественные изменения электрической активности сердца на 3-е и 7-е сутки наблюдения: инверсию зубца T, появление патологически глубокого зубца Q, зубца R с зубуринами. Только у 1 собаки, получившей препарат в дозе 20 мг/кг, на 3–7-е сутки наблюдения было отмечено уменьшение числа сердечных сокращений.

При гистологическом изучении внутренних органов собак, получивших препарат во всех дозах, произошли изменения различной степени выраженности в тонком кишечнике, почках, селезенке, щитовидной железе, гонадах. Кроме того, после введения ормустина в дозах ≥ 5 мг/кг обнаружены изменения в печени, сердце и лимфатических узлах, а после применения в дозах 20–30 мг/кг — также в толстой кишке, поджелудочной железе, надпочечниках, желудке, мочевом пузыре.

Так, в тонком кишечнике после применения ормустина в дозах 1–10 мг/кг на раннем сроке выявлен острый катаральный энтерит, приобретший к концу исследования характер хронического с признаками

Таблица 4. Динамика уровня мочевины в сыворотке крови собак после 3-кратного ежедневного внутривенного введения ормустина

Table 4. Dynamics of urea level in the blood serum of dogs after 3 times daily intravenous administration of ormustine

Доза суммарная, мг/кг Total dose, mg/kg	№ собаки/ пол No. of dog/ sex	Сутки наблюдения Day of observation								
		Фон 1 Background 1	Фон 2 Background 2	3 3	7 7	14 14	21 21	30 30	45 45	60 60
Мочевина (4,3—8,0 ммоль/л) Urea (4,3—8,0 mmol/l)										
1	1/♀	5,4	4,9	3,0	3,6	5,1	4,2	5,0	4,6	4,3
	2/♀	5,7	4,6	3,9	3,9	4,1	4,0	4,7	—	—
	3/♀	5,9	6,4	4,2	4,3	5,1	5,4	4,7	—	—
5	4/♀	4,8	4,5	4,2	3,8	4,7	4,3	3,7	—	—
	5/♀	5,3	4,6	3,4	3,0	4,3	5,4	5,1	—	—
	6/♀	6,0	5,1	3,0	3,7	4,0	3,8	4,3	4,6	4,7
10	7/♂	6,4	6,8	6,1	—	—	—	—	—	—
	8/♀	4,9	6,0	5,9	4,8	6,8	5,7	6,0	—	—
20	9/♂	5,9	6,1	3,9	—	—	—	—		—
	10*/♀	6,3	6,8	6,4	3,9	—	—	—	—	—
30	11/♀	5,3	4,7	4,9	—	—	—	—	—	—
	12*/♀	6,3	5,4	4,5	—	—	—	—	—	—

*Собака пала.

*The dog has died.

Таблица 5. Динамика активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови собак после 3-кратного ежедневного внутривенного введения ормустина

Table 5. Dynamics of lactate dehydrogenase activity in the blood serum of dogs after 3-times daily intravenous administration of ormustine

Доза суммарная, мг/кг Total dose, mg/kg	№ собаки/ пол No. of dog/ sex	Сутки наблюдения Day of observation								
		Фон 1 Background 1	Фон 2 Background 2	3 3	7 7	14 14	21 21	30 30	45 45	60 60
Лактатдегидрогеназа (50–495 Ед./л) Lactate dehydrogenase (50–495 Un/l)										
1	1/♀	119	61	192	53	81	337	103	146	148
	2/♀	206	143	125	78	59	196	128	—	—
	3/♀	102	76	147	56	79	122	94	—	—
5	4/♀	93	51	83	27	59	142	47	—	—
	5/♀	192	237	152	169	114	589	181	—	—
	6/♀	117	145	101	121	106	283	110	328	116
10	7/♂	221	134	74	—	—	—	—	—	—
	8/♀	94	151	143	25	110	204	184	—	—
20	9/♂	120	74	118	—	—	—	—	—	—
	10*/♀	173	80	74	42	—	—	—	—	—
30	11/♀	205	91	745	—	—	—	—	—	—
	12*/♀	173	158	141	—	—	—	—	—	—

*Собака пала.

*The dog has died.

частичной регенерации эпителия ворсинок. С увеличением доз препарата до 20–30 мг/кг отмечены более выраженные катарально-десквамативные воспалительные изменения с появлением очагов некроза эпителия ворсинок (рис. 1).

В почках всех животных выявлены выраженные воспалительные, дистрофические и деструктивные изменения в сосудистых клубочках и извитых канальцах, сохранявшиеся и на 60-е сутки. Помимо этого, у упавшей на 7-е сутки наблюдения собаки в почке обнаружен участок инфаркта (рис. 2).

Повреждающее действие ормустина на селезенку проявляется при применении его в дозах 10–30 мг/кг: на раннем сроке обнаружены деструктивные и гипопластические изменения лимфоидных клеток, обратимые к 30-м суткам наблюдения лишь в дозе 10 мг/кг. Кроме того, у собак, получивших препарат во всех дозах, отмечен отсроченный гемосидероз (рис. 3).

В щитовидной железе на всех сроках наблюдения обнаружены очаговые дистрофические, деструктивно-воспалительные изменения в фолликулах, которые носили немного более выраженный характер у собак, получивших препарат в дозах 20–30 мг/кг.

Деструктивные и дистрофические изменения в гонадах выявлены на ранних сроках наблюдения, они усиливались пропорционально примененной дозе препарата, сохранялись длительно и не обнаруживались лишь на 60-е сутки после курса его введения. В семенниках они выражались в виде десквамации сперматогенного эпителия канальцев, а в яичниках — в виде признаков атрезии фолликулов.

В печени отмечали очаговые, преимущественно дистрофические изменения гепатоцитов с признаками

ми обратимости к 60-м суткам наблюдения после воздействия препарата только в дозе 5 мг/кг (рис. 4).

Патологические изменения в миокарде проявлялись к 30-м суткам наблюдения в виде очагов отека и набухания кардиомиоцитов с изменением тинкториальных свойств их цитоплазмы, а после воздействия ормустина в самой высокой дозе были отмечены и на раннем сроке. К 60-м суткам наблюдения изменения уже не регистрировались. У собаки, павшей на 8-е сутки наблюдения, среди мышечных волокон обнаружены жировые клетки, часть которых замещают кардиомиоциты (рис. 5).

Повреждения лимфатических узлов, выражающиеся в виде лимфоцитарной гипоплазии, были отмечены уже на 3-и сутки наблюдения, сохранялись они длительно и к 60-м суткам не регистрировались. Помимо того, через 2 мес после окончания курса введения ормустина в мозговом веществе были обнаружены гемосидерофаги.

В толстом кишечнике на раннем сроке отмечена очаговая десквамация поверхностного эпителия, сохранявшаяся у павших собак.

Гистологическое исследование поджелудочной железы выявило повреждения ее экзокринных клеток в виде очагов дистрофии и деструкции клеток ацинусов у павших собак, а в дозе 30 мг/кг — и на раннем сроке.

В надпочечниках изменения выражались в виде вакуольной дистрофии, локализуемой на ранних сроках в мозговом веществе, и сохранялись у павших собак, причем у 1 из них повреждения обнаружены и в корковом веществе.

Большинство изменений были более выраженными и глубокими у павших собак. У них же обнаружены

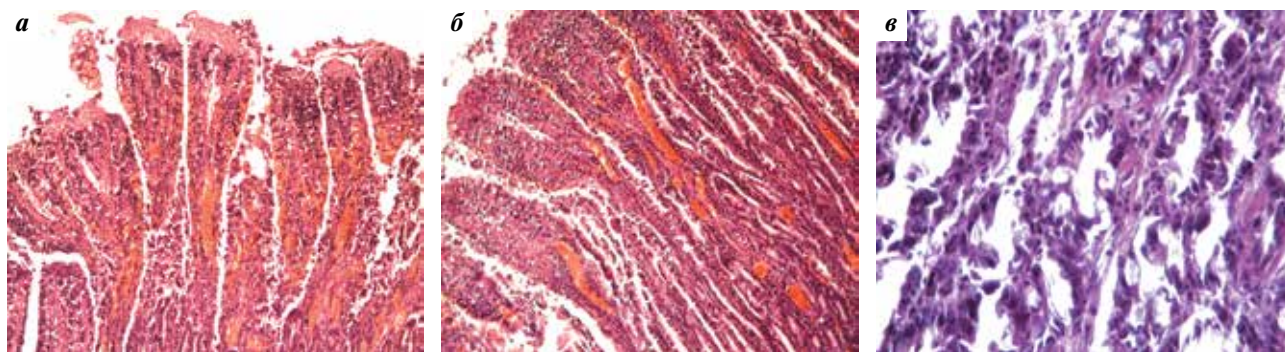


Рис. 1. Тонкая кишка собаки (окраска гематоксилином и эозином): а — ормустин в суммарной дозе 10 мг/кг, 3-и сутки после окончания введений. Воспалительные и деструктивные изменения слизистой оболочки: полнокровие, некроз апикальной зоны ворсинок, деструкция и десквамация каемчатого эпителия ворсинок ($\times 100$); б — ормустин в суммарной дозе 1 мг/кг, 30-е сутки после окончания введений. Тотальная десквамация эпителия ворсинок, выраженная сосудистая реакция и инфильтрация стромы ($\times 100$); в — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 7-е сутки после окончания введений. Дистрофия и деструкция клеток крипт в слизистой оболочке ($\times 400$)

Fig. 1. Dog's small intestine (hematoxylin and eosin staining): a — ormustine in a total dose of 10 mg/kg, 3rd day after the end of the injections. Inflammatory and destructive changes of the mucous membrane: plethora, necrosis of the apical zone of the villi, destruction and desquamation of the limbic epithelium of the villi ($\times 100$); б — ormustine in a total dose of 1 mg/kg, 30th day after the end of the injections. Total desquamation of the villus epithelium, severe vascular reaction and stromal infiltration ($\times 100$); в — ormustine in a total dose of 30 mg/kg, 7th day after the end of the injections. Dystrophy and destruction of crypt cells in the intestinal mucosa ($\times 400$)

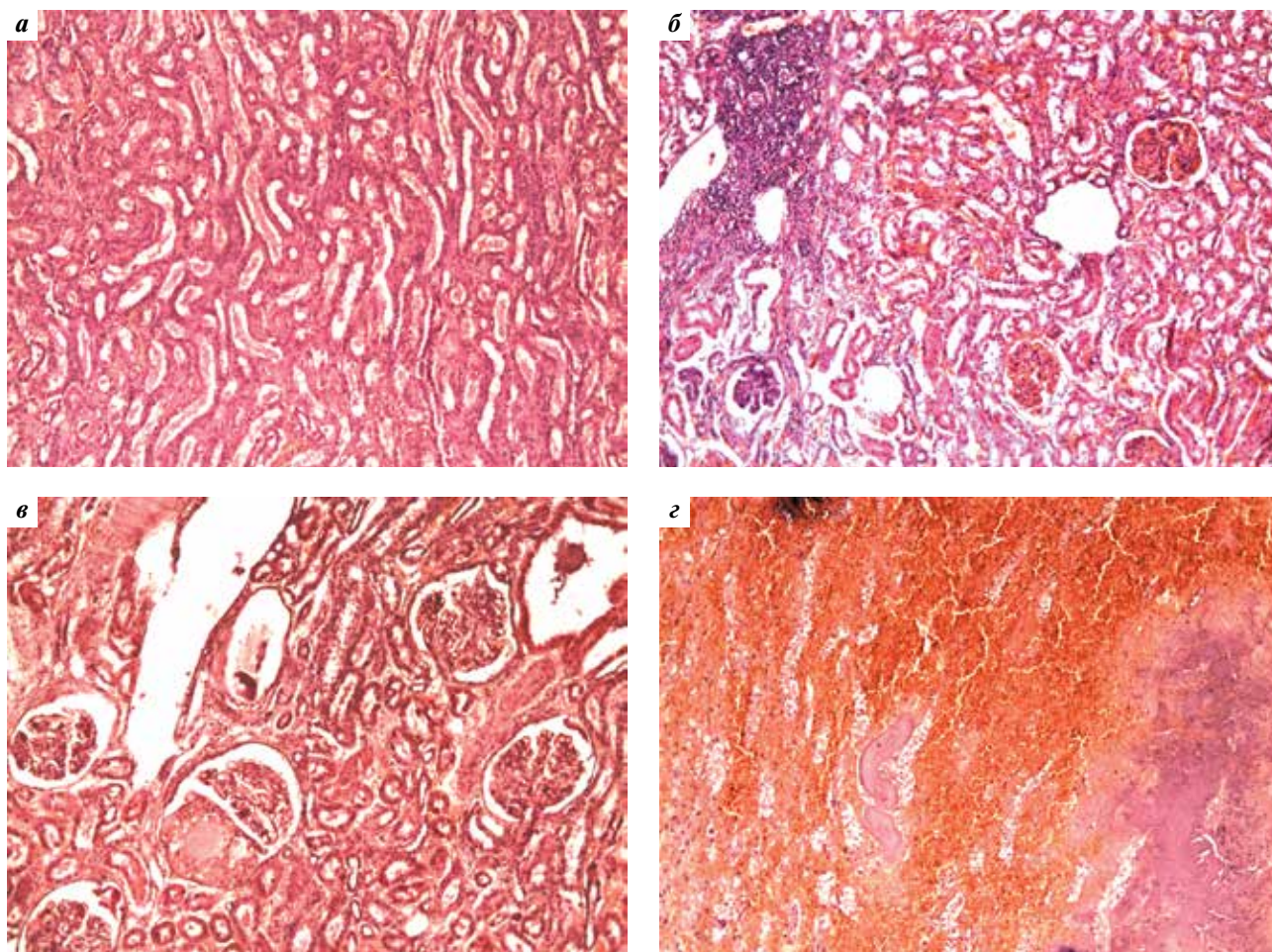


Рис. 2. Почка собаки (окраска гематоксилином и эозином): а — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 3-и сутки после окончания введений. Кортиковое вещество. Скопления рыхлого белка и десквамированного эпителия в просвете извитых и прямых канальцев ($\times 100$); б — ормустин в суммарной дозе 1 мг/кг, 30-е сутки после окончания введений. Кортиковое вещество. Крупный мононуклеарный инфильтрат, среди которого видны погибающие поврежденные извитые канальцы ($\times 100$); в — ормустин в суммарной дозе 1 мг/кг, 60-е сутки после окончания введений. Деструкция и атрофия сосудистых петель клубочков ($\times 400$); г — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 7-е сутки после окончания введений. Участок инфаркта почки ($\times 100$)

Fig. 2. Dog's kidney (hematoxylin and eosin staining): а — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 3rd day after the end of the injections. Cortical substance. Accumulations of loose protein and desquamated epithelium in the lumen convoluted and straight tubules ($\times 100$); б — ормустин в суммарной дозе 1 мг/кг, 30th day after the end of the introduction. Cortical substance. Large mononuclear infiltrate, among which dying injured convoluted tubules are visible ($\times 100$); в — ормустин в суммарной дозе 1 мг/кг, 60th day after the end of the introduction. Destruction and atrophy of the vascular loops of the glomeruli ($\times 400$); г — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 7th day after the end of the introduction. Infarct kidney site ($\times 100$)

деструктивные и дистрофические изменения в желудке и мочевом пузыре.

Совокупный анализ полученных данных позволяет утверждать, что суммарные дозы ормустина 20 и 30 мг/кг являются летальными, а суммарные дозы 1–10 мг/кг — переносимыми.

Внешние признаки нейротоксичности препарата, примененного во всех дозах, проявлялись мгновенно и сохранялись в течение суток после инъекции.

Ормустин обладает дозозависимой гематотоксичностью, частично обратимой в переносимых дозах. Препарат во всех дозах вызывает уменьшение количества лейкоцитов и колебание количества тромбоцитов периферической крови, а в дозах ≥ 5 мг/кг

провоцирует также снижение числа эритроцитов, уровней гемоглобина и гематокрита.

Выраженная стойкая гастроинтестинальная токсичность препарата, примененного во всех дозах, выявляется на ранних сроках посредством как клинических (снижение массы тела, диарея), так и гистологических признаков. Так, действие ормустина приводит к стойкому катаральному энтериту (в переносимых дозах — с некоторыми признаками поздней регенерации), а также к деструктивным изменениям покровного эпителия слизистой оболочки толстого кишечника и желудка у собак, получивших препарат в летальных дозах. Изменения экзокринных ацинарных клеток поджелудочной железы,

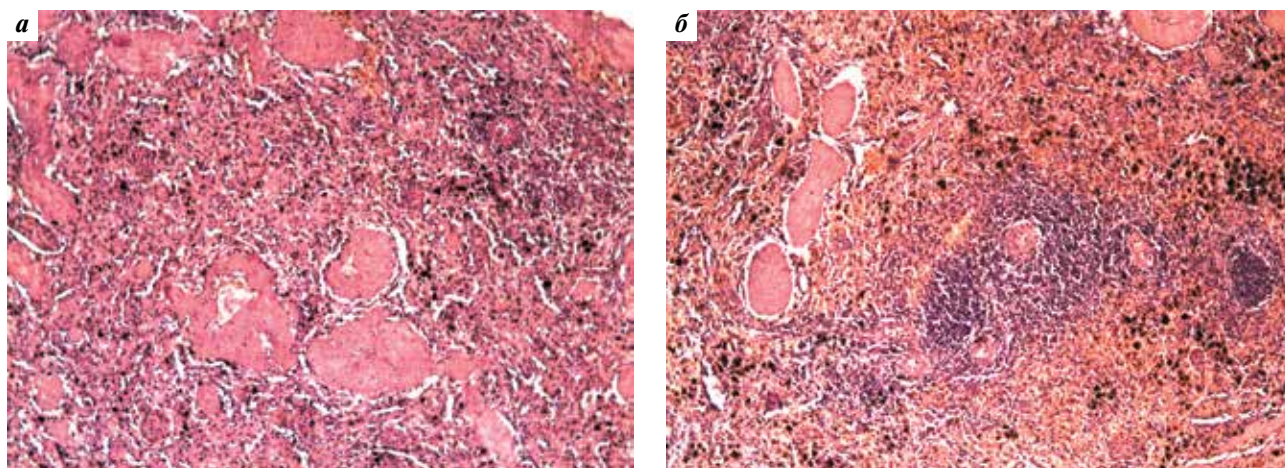


Рис. 3. Селезенка собаки (окраска гематоксилином и эозином): а — ормустин в суммарной дозе 20 мг/кг, 8-е сутки после окончания введений. Небольшой лимфатический фолликул с уменьшенным содержанием лимфоцитов в периартериальной зоне. Гемосидерофаги в красной пульпе ($\times 100$); б — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 7-е сутки после окончания введений. Атрофические изменения в красной и белой пульпе. Уменьшенное содержание лимфоцитов в фолликуле и ядросодержащих клеток в красной пульпе ($\times 100$)

Fig. 3. Dog's spleen (hematoxylin and eosin staining): а — ормустин в суммарной дозе 20 mg/kg, 8th day after the end of the injections. A small lymphatic follicle with a reduced content of lymphocytes in the periarterial zone. Hemosiderophages in the red pulp ($\times 100$); б — ормустин в суммарной дозе 30 mg/kg, 7th day after the end of the injections. Atrophic changes in red and white pulp. Reduced lymphocyte count in the follicle and nucleus-containing cells in the red pulp ($\times 100$)

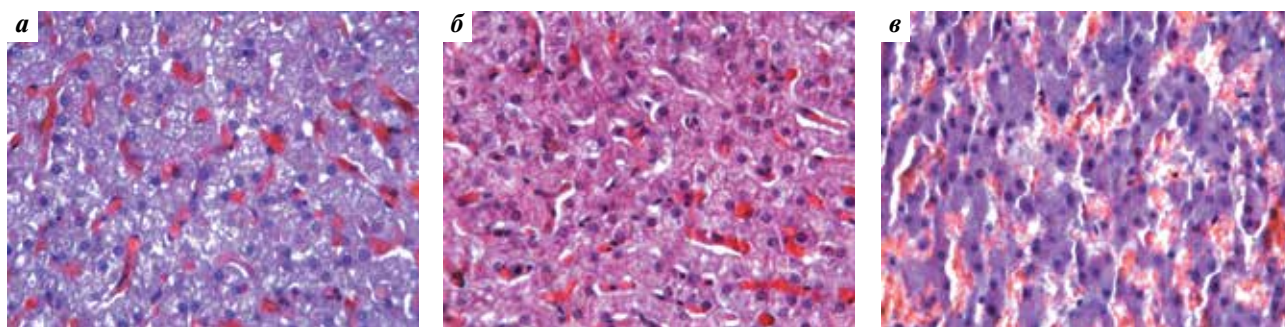


Рис. 4. Печень собаки (окраска гематоксилином и эозином): а — ормустин в суммарной дозе 20 мг/кг, 3-и сутки после окончания введений. Часть гепатоцитов с признаками вакуольной дистрофии. Синусоиды расширены и заполнены кровью ($\times 400$); б — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 7-е сутки после окончания введений. Нарушение балочной структуры, набухание цитоплазмы, гибель отдельных гепатоцитов, отсутствие ядер в некоторых клетках ($\times 400$); в — ормустин в суммарной дозе 5 мг/кг, 60-е сутки после окончания введений. Большая часть гепатоцитов в балках без изменений. В единичных гепатоцитах мелкокапельная жировая дистрофия ($\times 400$)

Fig. 4. Dog's liver (hematoxylin and eosin staining): а — ормустин в суммарной дозе 20 mg/kg, 3rd day after the end of the injections. Part of hepatocytes with signs of vacuolar dystrophy. Sinusoids are dilated and filled with blood ($\times 400$); б — ормустин в суммарной дозе 30 mg/kg, 7th day after the end of the injections. Violation of the beam structure, swelling of the cytoplasm, the death of individual hepatocytes, the absence of nuclei in some cells ($\times 400$); в — ормустин в суммарной дозе 5 mg/kg, 60th day after the end of the injections. Most of the hepatocytes in the beams are unchanged. Small-drop fatty degeneration dystrophy in single hepatocytes ($\times 400$)

по-видимому, связаны с истощением выработки панкреатических ферментов из-за выраженного воспаления в тонком кишечнике.

Стойкое выраженное нефротоксическое действие ормустина во всех дозах регистрируют в основном морфологически на ранних сроках в виде десквамативных и деструктивных изменений, переходящих в атрофические, а клинически — небольшим колебанием уровней мочевины и креатинина в сыворотке крови.

Репродуктивная токсичность препарата выражается в дозозависимых, частично обратимых в пере-

носимых дозах к 30-м суткам и полностью обратимых к 60-м суткам наблюдения деструктивных изменений в гонадах.

Тиреотоксичность препарата выражается в виде персистирующих деструктивных изменений фолликулов щитовидной железы.

Гепатотоксическое действие ормустина регистрируется морфологически в виде длительно сохраняющейся вакуольной дистрофии клеток печени и их некоторых деструктивных изменений, что проявляется клинически.

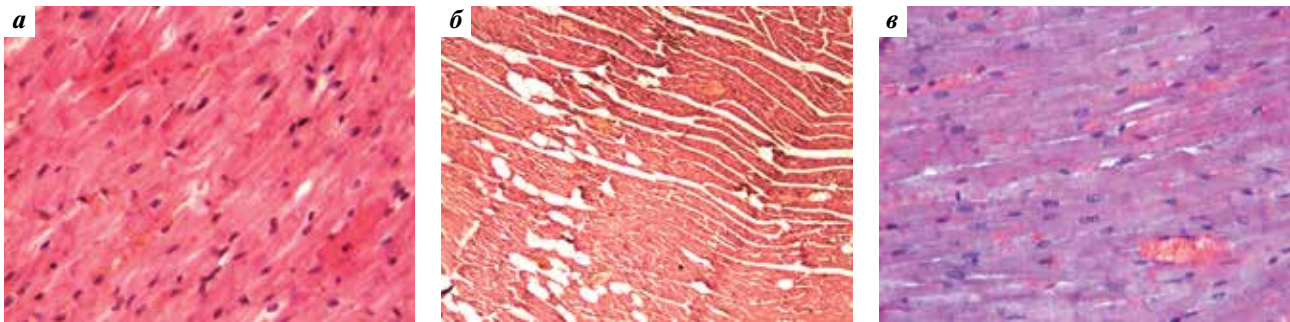


Рис. 5. Сердце собаки (окраска гематоксилином и эозином): а — ормусти́н в суммарной дозе 5 мг/кг, 30-е сутки после окончания введений. Миокард. Набухание и гиперэозинофильная окраска кардиомиоцитов ($\times 400$); б — ормусти́н в суммарной дозе 20 мг/кг, 8-е сутки после окончания введений. Миокард. Жировые клетки среди кардиомиоцитов, часть жировых клеток замещает кардиомиоциты ($\times 100$); в — ормусти́н в суммарной дозе 30 мг/кг, 7-е сутки после окончания введений. Миокард. Кардиомиоциты с признаками набухания, исчезновение поперечной-полосатой исчерченности ($\times 400$)

Fig. 5. Dog's heart (hematoxylin and eosin staining): а — ormustine in a total dose of 5 mg/kg, 30th day after the end of the injections. Myocardium. Swelling and hypereosinophilic staining of cardiomyocytes ($\times 400$); б — ormustine in a total dose of 20 mg/kg, 8th day after the end of the injections. Myocardium. Fat cells among cardiomyocytes, part of the fat cells replaces cardiomyocytes ($\times 100$); в — ormustine in a total dose of 30 mg/kg, 7th day after the end of the injections. Myocardium. Cardiomyocytes with signs of swelling, disappearance of striation ($\times 400$)

Кардиотоксичность препарата регистрируется клинически и морфологически в виде частично обратимых признаков гипоксии миокарда.

Дистрофические изменения надпочечников расценены нами как компенсаторная реакция организма на развившуюся полиорганную недостаточность.

Заключение

По результатам изучения субхронической токсичности ормустина суммарные дозы 20 и 30 мг/кг охарактеризованы как летальные. На основании клинической картины интоксикации, изменения пове-

денческих реакций, изменений в показателях периферической крови, изменений (и их обратимости) функционального и морфологического состояния исследованных внутренних органов суммарные дозы 5 и 10 мг/кг охарактеризованы как высокие токсические дозы, 1 мг/кг — низкая токсическая доза.

Наиболее выражены гастроинтестинальные, нефро- и тиреотоксические свойства ормустина, интенсивность которых практически не зависит от величины примененной дозы. Кроме того, препарат обладает дозозависимой выраженной гемато-, гепато-, кардио- и репродуктивной токсичностью.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Заридзе Д.Г., Каприн А.Д., Стилиди И.С. Динамика заболеваемости злокачественными новообразованиями и смертности от них в России. Вопросы онкологии 2018;64(5):578–91. [Zaridze D.G., Kaprin A.D., Stilidi I.S. Dynamics of morbidity and mortality from malignant tumors in Russia. Voprosy onkologii = Oncology issues 2018;64(5):578–91. (In Russ.)].
- Волкова А.Р., Вахитов Х.М., Кумирова Э.В. и др. Первичные злокачественные новообразования центральной нервной системы у детей: перспективы совершенствования диагностических и лечебных подходов. Тихоокеанский медицинский журнал 2019;76(2):8–10. DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2019.2.8–10. [Volkova A.R., Vakhitov Kh. M., Kumirova E.V. et al. Primary malignant neoplasms of cerebrospinal nervous system in children: perspectives of improvement of diagnostic and treatment approaches. Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal 2019;76(2):8–10. (In Russ.)].
- Кобяков Г.Л., Бекашев А.Х., Голанов А.В. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению первичных опухолей центральной нервной системы. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO 2018;8(3с2):83–99. DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-3с2-83-99. [Kobyakov G.L., Bekyashev A.Kh., Golanov A.V. et al. Practical recommendations for the medicinal treatment of primary tumors of the central nervous system. Malignant tumors: Practical recommendations RUSSCO 2018;8(3с2):83–99. (In Russ.)].
- Строяковский Д.Л., Абрамов М.Е., Демидов Л.В. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению меланомы кожи. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO 2018;8(3с2):213–26. DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-3с2-213-226. [Stroyakovskiy D.L., Abramov M.E., Demidov L.V. et al. Practical recommendations for the medicinal treatment of skin melanoma. Malignant tumors: Practical recommendations RUSSCO 2018;8(3с2):213–26. (In Russ.)].
- Краснов В.П., Левит Г.Л., Матвеева Т.В. и др. Nδ-нитрозо-Nδ-[(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитин. Патент РФ №2503657 от 10.01.2014. [Krasnov V.P., Levit G.L., Matveeva T.V. et al. Nδ-nitroso-Nδ-[(2-chloroethyl)carbamoyl]-L-ornithine. Patent of the Russian Federation № 2503657, 10.01.2014. (In Russ.)].
- 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. DOI: 10.3390/ph9040068.
7. 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 Journal of Biotherapy 2015;14(1):132–3. (In Russ.)].
 8. 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 Journal of Biotherapy 2015;14(1):133. (In Russ.)].
 9. Отчетные материалы Научного совета РАН по органической химии за 2015 год. М., 2016. Доступно по: <http://zioc.ru/files/Dostigenija%202015%20-%20to%20print.pdf>.
 10. 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. DOI: 10.17650/1726-9784-2015-14-4-65-72. [Chaley V.A., Konyaeva O.I., Ermakova N.P. et al. Preclinical toxicity study of a new antineoplastic drug Ormustine in small laboratory animals. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(4):65–72. (In Russ.)].
 11. Чалей В.А., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Предклиническое токсикологическое исследование Ормустина при применении у крыс в условиях субхронического эксперимента. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(4):98–105. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-98-105. [Chaley V.A., Konyaeva O.I., Ermakova N.P. et al. Pre-clinical study of subchronic toxicity of Ormustine on rats. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(4):98–105. (In Russ.)].
 12. Методические указания по изучению общетоксического действия противоопухолевых фармакологических средств. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 170–204. [Methodological instructions for studying the general toxic effects of antitumor drugs. In: Guideto experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Ed.: R.U. Khabriev, Moscow: Medicine, 2005. P. 170–204. (In Russ.)].
 13. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. 2-е изд., доп. М.: МДВ, 2008. 196 с. [Gus'kova T.A. Toxicology of medicines. 2nd edn. ed. Moscow: MDV, 2008. 196 p. (In Russ.)].

Вклад авторов

В.А. Чалей: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных;
Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
Т.В. Абрамова: получение данных для анализа;
В.М. Бухман: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных.

Authors' contributions

V.A. Chaley: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data, article writing;
O.I. Konyaeva, N.Yu. Kulbachevskaya: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
N.P. Ermakova, I.B. Merkulova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
T.V. Abramova: obtaining data for analysis;
V.M. Bukhman: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

В.А. Чалей/V.A. Chaley: <https://orcid.org/0000-0001-7867-2868>
О.И. Коняева/O.I. Konyaeva: <https://orcid.org/0000-0002-3814-5630>
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.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках ГК 13411.1008799.13 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства класса нитрозомочевин».

Financing. The research was performed within the framework of the State contract 13411.1008799.13 "Preclinical studies of antitumor drugs of the nitrosureas class".

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 00.00.2019. Принята к печати: 00.00.2019.

Article received: 00.00.2019. Accepted for publication: 00.00.2019.