

**КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ им. И.К. Ахунбаева**

**ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ
НАУК КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

С Т Е Н О Г Р А М М А

заседания диссертационного совета Д.03.17.558

9 апреля 2019 г. г. Бишкек

Председатель заседания - д. вет. н., профессор Жунушов А.Т.

Ученый секретарь - к. м. н., доцент Сабирова Т.С.

Председатель: глубокоуважаемые члены диссертационного совета, согласно явочному листу, из 19 утвержденных членов диссертационного совета Д.03.17.558 на заседании сегодня присутствуют 13 человек.

№№	Фамилия, И.О.	Ученая степень, шифры специальностей в совете
1	Зурдинов А.З.	докт. мед. наук, 14.03.06; 14.04.03
2	Жунушов А.Т.	докт. вет. наук, 03.01.06
3	Сабирова Т. С.	канд. мед. наук, 14.03.06
4	Исакова Ж. Т.	докт. мед. наук, 03.01.04
5	Исмаилов И. З	докт. фарм. наук, 14.04.01, 14.04.03
6	Умралина А. Р.	докт. биол. наук, 03.01.04
7	Махмудова Ж. А.	докт. биол. наук, 03.01.04
8	Асанакунунов Б. А.	канд. биол. наук, 03.01.06
9	Ли С. П.	докт. хим. наук, 03.01.04
10	Давлеталиева Н. Е.	докт. мед. наук, 14.03.06
11	Мураталиева А. Дж.	канд. фарм. наук, 14.04.01, 14.04.03
12	Тилекеева У. М.	докт. мед. наук, 14.03.06
13	Чонбашева Ч.К.	докт. мед. наук, 14.03.06

Председатель:

Уважаемые члены диссертационного совета, кворум у нас имеется, разрешите приступить к работе.

ПОВЕСТКА ДНЯ:

Предварительная защита диссертации к. мед. н., старшего научного сотрудника Института химии и фитотехнологий (ИХФ) НАН КР, и.о. доцента МВШМ МУК Камчибековой Ч. на тему: «Разработка нового противоопухолевого лекарственного препарата гликозил-нитрозометилмочевина-1» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология от 09.04.2019 г.

Председатель: слово Ученому секретарю для оглашения сведений о соискателе.

Ученый секретарь: разрешите представить Вам краткую информацию о соискателе. Камчибекова Ч. в 1973 году окончила лечебный факультет КГМИ, с 1974-79 гг. работала зав. отделением во 2-й городской клинической больнице № 2, с 1980 по настоящее время работает ст. н. с. в ИХФ НАН КР, в 1994 году защитила кандидатскую диссертацию, с 2004 г. работает и.о. доцента в МВШМ МУК по совместительству.

Научный консультант: член-корр. НАН КР, д.м.н., профессор Зурдинов А.З., кафедра базисной и клинической фармакологии КГМА им. И. К. Ахунбаева.

Тема диссертации и научный консультант были утверждены 18 января 2008 года решением Ученого Совета КГМА им. И. К. Ахунбаева (выписка из протокола Ученого совета № 3 от 18 января 2008 г.). Переутверждение темы докторской диссертации 27 мая 2016 г. решением Ученого Совета КГМА им. И. К. Ахунбаева (выписка из протокола Ученого совета № 9 от 27 мая 2016 г.).

Экспертная комиссия Диссертационного совета 03.17.558 от 27.12.2017 г. рекомендовала принять диссертацию к защите после устранения указанных в заключении замечаний. Экспертной комиссией дисссовета от 24.01.2019 г. дано заключение с рекомендацией назначить предзащиту в дисссовете.

В личном деле соискателя имеются все необходимые документы, соответствующие требованиям ВАК КР.

Председатель: слово предоставляется Камчибековой Ч. для изложения основных положений диссертационной работы.

Камчибекова Ч.: уважаемый председатель, уважаемые члены диссертационного совета!

Разрешите представить Вашему вниманию нашу работу на тему «Разработка нового противоопухолевого лекарственного препарата гликозил-нитрозометилмочевина-1» (слайд № 1).

Актуальность темы. 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 и расширением сферы побочных действий известных препаратов. Например, большая часть ПО препаратов проявляют гематотоксичность, иммунотоксичность, 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 малой токсичностью, хорошей растворимостью, 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 входит 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 токсичность нитрозомочевины (НМ) 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. Предполагается, что введение углеводных остатков в структуру биологически активных соединений приводит к резкому снижению их токсичности, что позволяет использовать метод гликозилирования соединения как один из возможных путей получения малотоксичных лекарственных средств. На основании этой проблемы в Институте химии и фитотехнологий НАН КР проводился в течение ряда лет направленный синтез производных НММ и в результате этих работ была получена субстанция гликозил-нитрозометилмочевина (гликозил-НММ-1).

Целью исследования является научное обоснование разработки новой цитостатической ПО субстанции со сниженным потенциалом токсичности в группе производных НММ и доклинического исследования фармакологии и токсикологии оригинальной субстанции из группы производных НММ - гликозил-НММ-1 (слайд № 2).

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

1. Изучить физико-химические свойства субстанции гликозил-НММ-1, предназначенной для внутривенного введения.
2. Определить острую и хроническую токсичность гликозил-НММ-1.
3. Выявить специфическую ПОА субстанции гликозил-НММ-1.

4. Исследовать специфические виды токсичности гликозил-НММ-1 (местно-раздражающее действие, аллергогенность, иммунотоксичность, кумулятивные, канцерогенные, мутагенные, эмбриотоксические и тератогенные свойства).
5. Изучить фармакокинетические параметры гликозил-НММ-1.
6. Исследовать способ лечения АОЭ у животных-опухоленосителей, перспективность разработки нового ПО препарата на основе субстанции гликозил-НММ-1.

Научная новизна работы обусловлена тем, что большое внимание уделяется работам, связанным с созданием новых эффективных и безопасных ПО средств:

- Впервые изучены физико-химические свойства субстанции гликозил-НММ-1, предназначенного для внутривенного введения, установлены параметры неспецифической и специфической токсичности, изучена фармакокинетика.
- Впервые среди производных НММ найдена субстанция с минимальным уровнем токсичности.
- Впервые установлено ПО терапевтическое действие гликозил-НММ-1.
- Впервые оригинальная субстанция из группы производных НММ обоснована 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».

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Получена новая субстанция из производных НММ - гликозил-НММ-1, разработана лекарственная субстанция, изучен состав, физико-химические свойства.
2. Изучена острая и хроническая токсичность гликозил-НММ-1.
3. Доказано наличие специфической ПОА субстанции гликозил-НММ-1.
4. Изучена фармакокинетика гликозил-НММ-1 при внутривенном введении.
5. Обоснована возможность создания нового ПО препарата на основе субстанции гликозил-НММ-1 (слайд №3).

Материалы и методы исследования. 1. Объекты исследования - новая ПО субстанция гликозил-НММ-1, препарат сравнения - циклофосфамид; Эксперименты проведены на 2368 животных: 1340 белых беспородных и мышцах линии BALBC массой 18-22 г, 888 крысах линии Vistar (160-200 г), 96 морских свинок (360-420 г) и 44 кроликах породы Scintilla (3-3,5 кг) обоих полов.

1. Физико-химические методы исследования гликозил-НММ-1 проводились в соответствии с Государственной Фармакопеей (ГФ) XI изд. (М., 1987, 1990) и XIII изд. (М., 2015) для сухих лекарственных субстанций, предназначенных для парентерального введения; метод спектрофотометрии и

УФ спектра; метод ТСХ; метод К. Фишера; определение количественного содержания субстанции и её компонентов. Аппаратура: спектрофотометр, пластинки «Силуфол» для ТСХ, химические реактивы, посуды, установка LGA-0,5, сублиматор, ХГ и др.

«Результаты собственных исследований и их обсуждение» приводятся результаты изучения физико-химических свойств гликозил-НММ-1: цвет; подлинность 0,1% раствора субстанции методом спектрофотометрии и УФ спектра; температура плавления методом 1 и 1а; удельное вращение (α) расчетным методом при концентрации вещества 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 ТСХ; содержание воды методом К.Фишера; сульфатная зола; тяжелые металлы; отклонение массы содержимого одного флакона от средней массы; стерильность. Количественное содержание гликозил-НММ-1 и её компонентов: *ксилозы безводной, метилмочевины, п-аминобензойной кислоты, этанола, кислоты хлористоводородной, натрия нитрита, воды дистиллированной* в одном флаконе (слайд № 4-5).

2. Фармакологические исследования проводились согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств», (М., 2012) и «Временным методическим рекомендациям МЗ КР. Требованиям к доклиническому изучению общетоксического действия новых фармакологических веществ» ДЛО и МТ МЗ КР (Б., 2000). Методы исследования: фармако-токсикологические (специфические, неспецифические), клинико-лабораторные, биохимические, анатомо-морфологические, цитологические, способы лечения, фармакокинетические и др. Аппаратура: весы медицинские, электротермометр марки ТПЭМ-1, гематологический анализатор, камера Горяева, аппарат Панченкова, вода для инъекций, химические реактивы, посуды и др. Статистическая обработка результатов исследований проводилась по методу программы «Стат-6» Excel (М., 2012) с использованием критериев Фишера и Стьюдента $P \leq 0,95$ (слайд № 6).

Изучение острой токсичности гликозил-НММ-1 проводилось в IV сериях опытах на 120 белых беспородных мышах-самцах и крысах массой 22-25 г и 180-200 г обоих полов в сравнении с циклофосфамидом. Субстанция вводилась однократно внутрибрюшинно (в/б) и внутривенно (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 эквивалентный объем раствора хлорида натрия (0,9 %). По методу Литчфилда и Уилкоксона определялась ЛД₅₀ - доза, вызывающая гибель 50 % животных, рассчитаны: ЛД₁₆ и ЛД₈₄. 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 циклофосамида 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 циклофосамида.

Для выявления токсического резорбтивного действия гликозил-НММ-1 проводилось морфологическое изучение органов животных. Погибшие животные вскрывались согласно общепринятым методам, у выживших животных проводился ежедневный контроль массы тела. Из каждой группы забивалось по 3 животных под эфирным наркозом. Забирались внутренние 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, окрашивались гематоксилином и эозином. Микроскопию проводили на микроскопе МБИ-15-2.

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. Т.о., результаты изучения гликозил-НММ-1 показали, что отмечаются некоторые структурные изменения в органах животных, признаков патологических изменений не обнаружено (слайд № 7).

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

Было сформировано 8 групп : I-II - контрольные (виварийные и интактные), III-VIII – опытные. С III-V группам 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 циклофосамид (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. Изучение влияния гликозил-НММ-1 на массу тела животных проводилось по общеизвестной методике. Определение массы тела проводилось ежемесячно. В первые дни опыта масса тела животных, как у опытных, так и у контрольных групп находилась в пределах физиологической нормы. Однако средние значения массы тела имели групповые различия. В течение трех месяцев опыта, по сравнению с исходными данными, масса тела у животных в контрольных группах находилась в норме. После введения

гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг прибавка в массе находилась в пределах физиологической нормы. В дозах 33 и 16 мг/кг потеря в массе тела не наблюдалось. Результаты изучения гликозил-НММ-1 показали, что во все периоды наблюдения масса тела находилась в норме. Следовательно, гликозил-НММ-1 в исследуемых дозах в течение трех месяцев опыта не снижает массу тела. При введении циклофосфида отмечается потеря в массе тела.

Пирогенное действие гликозил-НММ-1 и циклофосфида на организм изучалось методом измерения базальной температуры до опыта и через 1; 2 и 3 месяца электротермометром марки ТПЭМ. 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 $1,4^{\circ}\text{C}$. После введения субстанции и циклофосфида в дозах 65 и 3 мг / кг у животных, 4-х из испытанных групп, из III и VI групп разность температуры не превышала $0,6^{\circ}\text{C}$. Введение субстанции у животных, 4-х из испытанных групп, из III опытной группы, разность температуры, не превышала $0,6^{\circ}\text{C}$ по сравнению с исходными данными. Введение гликозил-НММ-1 в дозе 33 мг/кг у животных IV опытной группы, из 4-х из испытанных групп, у IV группы не наблюдался подъема температуры на более $0,6^{\circ}\text{C}$. При трехмесячном введении исследуемых средств в дозах 16 и 1 мг/кг у животных V опытной группы, 4-х из испытанных групп, у V группы температура не превышала $0,6^{\circ}\text{C}$ по сравнению с исходными показателями. Т.о., измерения ректальной температуры у крыс при введении гликозил-НММ-1 и циклофосфида в исследуемых дозах в течение трех месяцев показали, что не вызывают повышения температуры более $0,6^{\circ}\text{C}$ и не обладают пирогенным действием.

Проведено изучение действия гликозил-НММ-1 и циклофосфида на ССС и дыхательную систему методом записи биоэлектрической активности миокарда крыс на электрокардиографе ЭКК-01 во II стандартном отведении, с последующим анализом ЭКГ и подсчетом числа дыханий в 1 минуту. Влияние гликозил-НММ-1 и препарата сравнения 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 результатов исследования ЭКГ и частоты дыхания показали, что гликозил-НММ-1 и циклофосфамид в течение трех месяцев не оказывают токсического действия на функции ССС и органов дыхания.

Анализ крови проводилось на гематологическом анализаторе, подсчитывалось количественное содержание гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, лейкоцитарная формула и скорость оседания эритроцитов (СОЭ). Показатели гемоглобина находились в пределах нормы. Количество эритроцитов в крови у контрольных групп во все сроки эксперимента оставалось на уровне исходных значений. Следовательно, гликозил-НММ-1 и

циклофосфамид не оказывают влияния на эритропоз. После введения субстанции в дозе 65 мг/кг наблюдалась тенденция к незначительному снижению количества лейкоцитов в крови. Уровни абсолютного и относительного количества лимфоцитов находились в норме. В дозах 33 и 16 мг/кг снижения количества лейкоцитов в крови не вызывает. Под влиянием циклофосфамида в дозе 3 мг/кг в крови у животных отмечалась выраженная лейкопения и тромбоцитопения. Показатели красной крови были повышенными, наблюдалась тенденция к угнетению миелопоэза. Следовательно, гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг вызывает тенденцию к незначительной лейкопении. Циклофосфамид приводит к более выраженной лейкопении, снижению содержания относительного и абсолютного количества лимфоцитов в крови, тромбоцитопении, повышению показателей красной крови и тенденции угнетения миелопоэза (**слайд № 8**).

Влияние гликозил-НММ-1 на клеточные элементы костного мозга: созревания эритробластов, костномозгового индекса нейтрофилов и лейко-эритробластического соотношения изучалось по общеизвестной методике. Гликозил-НММ-1 в дозах 65; 33 и 16 мг/кг в клеточном элементе костного мозга не вызывает снижения количества лимфоцитов, ретикулоцитов, мегакариоцитов, повышения числа незрелых клеток миелоидного ряда и лейко-эритробластического соотношения. Субстанция в дозе 65 мг/кг не повышает число незрелых клеток миелоидного ряда, не уменьшает количество клеточных элементов эритропоэза и не угнетает гемопоэз, миелограмма соответствовала норме. В дозе 33 мг/кг вызывает незначительное снижение клеток эритроидного ростка, с полным восстановлением миелограммы к концу наблюдения. Т.о., гликозил-НММ-1 в испытываемых дозах не влияет на клеточные элементы костного мозга. Циклофосфамид снижает содержание лимфоцитов, мегакариоцитов и лейко-эритробластическое соотношение в клеточном элементе костного мозга (**слайд № 9**).

Изучение влияния гликозил-НММ-1 и циклофосфамид на обмен веществ (белковый, углеводный, жировой) общий белок, белковые фракции проводилось по общеизвестным методам. Субстанция в дозе 65 мг/кг не изменяет количества общего белка. В дозах 33 и 16 мг/кг не уменьшает количество общего белка в сыворотке крови, не снижает состав сывороточных белков: альбуминов, альбуминно-глобулинового коэффициента, не повышает количество α -, β - и γ -глобулинов. Гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг не изменяет липидный обмен, уровень общих липидов и β -липопротеидов в сыворотке крови. В дозах 33 и 16 мг/кг не наблюдается повышения уровня общих липидов и β -липопротеидов в сыворотке крови. Следовательно, 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 .

Изучение влияния гликозил-НММ-1 и препарата сравнения на биохимические показатели сыворотки крови: креатинин, мочевины, остаточный азот, общие липиды, β -липопротеиды, холестерин, сахар крови проводилось по общеизвестным методам. Результаты изучения показали, что гликозил-НММ-1 и препарата в исследуемых дозах в течение трех месяцев на содержание креатинина, мочевины, остаточного азота и холестерина крови не вызывают изменений. Влияние субстанции и препарата в испытуемых 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 гликозил-НММ-1 и препарат не влияют на инсулярный аппарат поджелудочной железы. Проведено изучение влияния средств на содержание глюкозы. Установлено, что гликозил-НММ-1 и циклофосфамид в испытуемых дозах не повышают уровень глюкозы в крови. Т.о., гликозил-НММ-1 и препарат не вызывают повышения уровня глюкозы в крови и не обладают диабетогенным эффектом.

Действие субстанции и препарата сравнения на активность неспецифических оксидаз печени оценивалось по продолжительности сна животных после введения гексенала. Определялась масса тела животных и в/б вводился раствор гексенала в дозе 90 мг/кг на изотоническом 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 пределах нормы. 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. Результаты опыта показали, что введение субстанции в испытуемых дозах в течение трех месяцев не влияет на активность неспецифических оксидаз печени, оцениваемую по продолжительности сна. Следовательно, гликозил-НММ-1 в исследуемых дозах в течение трех месяцев 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 (**слайд № 10**).

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, которое

нормализовалось в восстановительный период. Выделения сахара с мочой не обнаружено. Субстанция в дозах: 33 и 16 мг/ кг 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. Т.о., 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 незначительно уменьшает суточный диурез.

Для оценки ориентировочно-исследовательских реакций и состояния рефлексов ЦНС у животных применялась методика «открытого поля» и регистрировалось число горизонтальных и вертикальных перемещений, грумингов, количество дефекаций; следовательно, гликозил-НММ-1 и циклофосфамид в исследуемых дозах не нарушают поведенческие реакции у животных в тесте «открытого поля». Действие гликозил-НММ-1 и циклофосфамида в течение трех месяцев на состояние ориентировочных рефлексов изучалось на мышах, с использованием теста «залезания на сетку». Результаты проведенных опытов показали, что при введении гликозил-НММ-1 и циклофосфамида у животных не отмечалось снижения ориентировочного рефлекса, поднявшихся в течение 5 минут по проволочной сетке по сравнению с контролем. Изучение влияния гликозил-НММ-1 и препарата сравнения на рефлекс «подтягивания» задних конечностей проводилось с целью выявления миерелаксирующего действия. Результаты опыта показали, что при помещении передних конечностей на горизонтально натянутую проволоку у всех животных опытных групп в исследуемых дозах, реакция «подтягивания» задних конечностей не нарушалась. Критерием эффекта утраты рефлекса «положения» служил помещение животного на спину на протяжении двух минут. Установлено, что при введении субстанции и циклофосфамида все животные не сохраняли «боковое положение» в течение двух минут. Влияние субстанции и циклофосфамида в исследуемых дозах в течение трех месяцев на изменение координации движения у животных оценивалось с помощью теста «вращающегося стержня». Гликозил-НММ-1 и циклофосфамид не нарушают координацию движения **(слайд 11)**.

С целью исключения токсического действия и в дополнение к изучению хронической токсичности проводилось морфологическое изучение органов и тканей животных после введения гликозил-НММ-1 и циклофосфамида в течение 1, 2 и 3-х месяцев. Морфологическое исследование показало, что гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг вызывает у животных незначительные изменения в структуре отдельных внутренних органов: желудка, тонкого и толстого кишечника, почек, носящие адаптивный характер. Не выявлено увеличения относительной массы печени, надпочечников, селезенки, тимуса и

лимфатических узлов, что свидетельствует о нетоксичности гликозил-НММ-1, отсутствии кумулятивного и мутагенного эффекта. Данные динамики относительной массы органов под влиянием субстанции в дозе 65 мг/кг показали, что относительная масса органов: надпочечники, селезенка, тимус и лимфатические узлы в пределах физиологической нормы, что свидетельствует о нетоксичности субстанции, отсутствии кумулятивного эффекта и мутагенной активности. Циклофосфамид в слизистой желудка, кишечника вызывает атрофические, дегенеративно-дистрофические изменения, воспалительную инфильтрацию стромы, подслизистого слоя; расширение сосудов, деструктивные, дистрофические изменения, серозное воспаление и очаги микронекроза в печени; оказывает токсическое действие на почки: происходит набухание стенок артериол, дегенерация эпителия канальцев, которая приводит к изменениям в эндокринной системе; снижает функцию щитовидной железы; наблюдаются очаги гемопоэза в стволовых гемопоэтических клетках; в рыхлой соединительной ткани происходит торможение накопления клеточных элементов, уменьшается число и активность перитонеальных макрофагов **(слайд 12)**.

Изучение специфической ПОА гликозил-НММ-1 проводилось на стандартной линии мышах BALBC с АОЭ согласно «Методическим рекомендациям по доклиническому изучению специфической активности фармакологических веществ» (М., 2000, 2005), «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», (М., 2005) и «Методическим рекомендациям по первичному отбору противоопухолевых препаратов» в сравнении с циклофосфамидом.

Асцитный вариант АОЭ является опухолью высокой степени злокачественности. Возможность точного введения опухолевых клеток и быстрый рост патологического процесса делают данный штамм рака удобным тест-объектом при первичном отборе ПО препаратов (штамм опухоли был получен из банка музея РФ). Перевивка опухолевых клеток проведена в/б способом 160 линейным мышам массой 20-25 г. Введение опухолевых клеток, содержащихся в 0,5 мл/мышь обеспечило развитие выраженного асцита. Было 8 групп: I-II - контрольные, III-VIII – опытные группы, которые получали в/б гликозил-НММ-1 в дозах: 40; 20 и 10 мг/кг и циклофосфамид: 2; 1 и 0,5 мг/кг по 0,4 мл в течение 10-и дней. Контрольным животным-опухоленосителям вводился изотонический раствор хлорида натрия (0,9 %) в эквивалентном объеме. Результаты исследования асцитного варианта АОЭ показали, что гликозил-НММ-1 в дозе 40 мг/кг снижает массу тела у животных-опухоленосителей до нормы, полностью уменьшая объем опухоли и увеличивает ПО эффект до 93 %, вызывает значительное снижение количества лейкоцитов в крови до нормы.

Циклофосфамид в исследуемых дозах уменьшает массу тела у опухоленосителей в 2 раза меньше; угнетает лейкопоз: относительное и абсолютное количество лимфоцитов, вследствие чего, вызывает выраженную лейкопению, общее количество лейкоцитов в периферической крови снижается наполовину по сравнению с контрольными-опухоленосителями; ТРО составляет 47 %. Менее чувствительна к препарату сравнения перевивная АОЭ (слайд 13).

Нами проводилось цитологическое исследование ПОА гликозил-НММ-1 на асцитном варианте АОЭ у животных-опухоленосителей. Материал для исследования получен у интактных-опухоленосителей в виде пункционной биопсии брюшной полости на 12-й день и наносился на предметные стекла. При анализе выявлены клетки, лежащие отдельно 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 заметно уменьшились. Обнаружены мезотелиальные клетки с апоптозом в периоде лизиса с формированием клеток-«теней». После введения циклофосфамида в дозе 2 мг/кг опухолевые клетки уменьшились незначительно. 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 также незначительно. Просматривались мезотелиальные клетки.

Проводилось морфологическое исследование ПОА гликозил-НММ-1 на асцитном варианте АОЭ у животных-опухоленосителей. Результаты патоморфологического изучения показали, что в структуре внутренних органов у опухоленосителей ПО эффект проявляется повреждением опухолевой ткани: полиморфизм клеток, образование многоядерных клеток и очагов некроза. В клетках опухоли наблюдаются выраженные 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 (слайд 14).

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 в динамике на 7-й, 14-й и 21-е дни полностью уменьшилась; ТРО составило 97 %, СПЖ равняется 81%, ПОА оценивалась по УПЖ (175 дней); уменьшалось количество лейкоцитов в крови до нормы. Под влиянием препарата сравнения масса опухоли уменьшилась в 2 раза, ТРО составило 47 %, СПЖ равняется 81%, ПОА оценивалась по УПЖ (175 дней); уменьшалось количество лейкоцитов в крови до нормы.

происходило угнетение лейкопоза за счет относительного и абсолютного количества лимфоидных элементов крови, незначительно снизилось количество лейкоцитов по сравнению с контрольными-опухоленосителями. К препарату сравнения менее чувствительна перевивная АОЭ. Нами проводилось морфологическое исследование ПОА гликозил-НММ-1 на подкожном варианте АОЭ у опухоленосителей. Результаты исследования внутренних органов свидетельствуют о том, что в микроструктуре органов у опухоленосителей происходят аналогичные изменения, как при специфической ПОА асцитного варианта АОЭ. Гликозил-НММ-1 и циклофосфамид соответствуют критериям ПО действия в первичном скрининге по отбору ПО средств (слайд 15).

Исследование фармако-токсикологических свойств субстанции гликозил-НММ-1. Местно-раздражающее действие субстанции изучалось в двух сериях опыта на 60 морских свинках. Результаты I серии опыта показали, что после введения субстанции и циклофосфамида 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 и циклофосфамид 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 и препарата сравнения в течение недели показало отсутствие местно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия. Т.о., гликозил-НММ-1 и циклофосфамид 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 проявляют.

Возможное аллергогенное действие изучалось на морских свинках и крысах. Изучение аллергогенного действия субстанции и циклофосфамида в исследуемых дозах при 28-и дневном введении в 2-х сериях опыта показало отсутствие кожно-резорбтивного действия, аллергической реакции и падения общего числа лейкоцитов в крови. Исследования микроструктуры внутренних органов показали отсутствие аллергогенного действия. Т.о., гликозил-НММ-1 и циклофосфамид в исследуемых дозах при 28-дневном введении в двух сериях опыта показали отсутствие кожно-резорбтивного и аллергогенного действия средств.

Изучение возможных кумулятивных свойств гликозил-НММ-1 проводилось по "тесту субхронической токсичности". 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 (НМ, 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 (слайд 16).

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. Содержание Т-лимфоцитов также определялось с помощью эритроцитов, нагруженных антителами и комплементом (ЕАС-РОК). Изучение гуморальной иммунной системы проводилось по методу антителообразующих клеток (АОК) (В-лимфоциты). Числа АОК, первичные и вторичные иммунные реакции определялись по методу Каннинггема и Шенберга (1968) и по Морозову В. Л. и др. (1989). Результаты исследования показали, что после введения 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. 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 испытываемых 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, у животных, получавших субстанцию в дозе 10 мг/кг оставалась без изменений. Введение субстанции в дозе 40 мг/кг на число АОК (95,1% к контролю) отрицательного влияния не оказывало. Подобный максимальный эффект наблюдался в дозах 20 и 10 мг/кг, 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. 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 % **(слайд 17)**.

Результаты морфологического изучения иммунотоксического действия 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 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 **(слайд 18)**.

Изучение канцерогенных свойств субстанции проводилось согласно «Методического письма по исследованию бластомогенных свойств различных веществ в опытах на животных» и (М., 2012). Проведено исследование возможного канцерогенного действия гликозил-НММ-1 в течение 24-х месяцев, наблюдение за животными проводилось до их естественной гибели. Изучаемые дозы субстанции 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. У всех животных забирались внутренние органы для морфологических исследований. В ходе опыта часть животных забивалась, а их органы – гистологическому исследованию. Способность гликозил-НММ-1 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. 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. Результаты 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 16 мг/кг V опытной группы обнаруживались подкожные образования. Процент возникающих образований показал отсутствие канцерогенного эффекта. 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 субстанции выявило, что показатели крови находились в пределах нормы. После введения гликозил-НММ-1 в дозе 24 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 12 и 6 мг/кг снижения количества эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов не наблюдалось по сравнению с контрольными группами. Т.о., при введении гликозил-НММ-1 в дозе 65 мг/кг наблюдалась тенденция к снижению количества лейкоцитов в периферической крови без нарушения лимфопоэза. При вскрытии у погибших животных обнаружены доброкачественные подкожные опухолевидные образования, что свидетельствовало об отсутствии опухолевого роста, а гибель животных была связана с естественным процессом. При обзорной микроскопии 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 (слайд 19).

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. Изучение мутагенных свойств проводилось с целью определения риска в отношении повреждения ДНК и фиксации этих повреждений ДНК в форме генных мутаций. Исследования генотоксичности веществ проводятся как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* с целью выявления компонентов, индуцирующих генетическое повреждение ДНК вследствие различных механизмов.

Клетки мышинной лимфомы L5178Y являются чувствительными индикаторами мутагенной активности широкого спектра химических соединений в микроядерном тесте и характеризуются высокой стабильностью и низким уровнем спонтанного образования микроядер. Выбор концентраций субстанции проводился по методике согласно руководству. Диапазон исследуемых концентраций гликозил-НММ-1 составил от 0,1625 мг/мл до 0,016 мг/мл. Изучение мутагенности гликозил-НММ-1 проводили с помощью метода учета образования микроядер. Результаты изучения индукции образования микроядер изучаемой субстанции гликозил-НММ-1 в микроядерном тесте без метаболической активации генотоксичностью не обладает.

В результате проведения микроядерного анализа гликозил-НММ-1 в условиях *in vitro* с метаболической активацией фракцией S9 в культуре клеток L5178Y было установлено, что после метаболической активации субстанции исследование её мутагенного свойства дало отрицательный результат. Т.о, результаты изучения 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, показывает об отсутствии мутагенной активности гликозил-НММ-1 вызывать нарушения в хромосомном аппарате клеток **(слайд 20)**.

Эмбриотоксические и тератогенные свойства проводились в соответствии с «Методическими указаниями по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и их влияния на репродуктивную функцию» (М., 2012). Исследования субстанции и циклофосамида на крысах обоих полов показали, что у беременных крыс наблюдался прирост массы тела на 1-й, 7-й, 14-й и 20-е дни. На 2-й неделе введения субстанции в дозе 24 мг/кг отмечалось незначительное снижение прироста массы, которое в последующем нивелировалось, и к концу беременности общая прибавка прироста массы незначительно превышала контрольное значение. В дозах 12 и 6 мг/кг на

второй неделе введения снижения прироста массы не отмечалось, к концу беременности общая прибавка прироста массы незначительно превышала.

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 **(слайд 21)**.

Изучение фармакокинетических параметров гликозил-НММ-1 в сыворотке крови крыс после внутривенного введения 6 мг/кг проводилось в сопоставлении со временем циркуляции в кровотоке в сравнении с фармакокинетическими характеристиками гликозил-НММ-1, собственно нитрозомочевины. 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 производных НАМ (НММ, араноза и др.) характерно быстрое исчезновение из крови. Результаты изучения содержания гликозил-НММ-1 в кровотоке показали, что после введения через 15 минут в плазме крови определяются лишь следы, которые быстро исчезают из кровотока. Гликозил-НММ-1 близка к другим производным НАМ по продолжительности циркуляции в крови, которая у циклофосфамида равна 6 часам и свидетельствует о слабой обратимости его токсического действия. Т.о., субстанция гликозил-НММ-1, близка к другим НАМ (НММ, араноза и др.) по продолжительности циркуляции в крови. Гликозил-НММ-1 близок к производным НАМ по продолжительности циркуляции в крови, которая для циклофосфамида равна 6 часам **(слайд 22)**.

Способ лечения асцитного варианта АОЭ с гликозил-НММ-1 проводился на опухоленосителях согласно «Методическим рекомендациям по первичному отбору ПО препаратов», (М., 1980) в сопоставлении с циклофосфамидом. С целью лечения асцитного варианта АОЭ гликозил-НММ-1 вводилась в

следующих дозах: 100 мг/кг 1 раз; 50 мг/кг 2 раза; 30 мг/кг 3 раза и 9 мг/кг ежедневно в течение 1-10 дней; циклофосфамид использовался 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. Результаты исследования показали, что гликозил-НММ-1 при асцитном варианте АОЭ способствует снижению количества лейкоцитов в периферической крови до нормы, при этом уменьшается масса тела и объем асцитной опухоли, ПО эффект составляет 93%. При цитологическом исследовании асцитного варианта АОЭ обнаружены мезотелиальные клетки с апоптозом, опухолевые клетки находились в состоянии лизиса с образованием клеток-«теней». На фоне лечения с гликозил-НММ-1 в исследуемых дозах опухолевые клетки заметно уменьшились. При применении циклофосфамида наблюдается выраженное снижение количества лейкоцитов в крови, угнетение относительного и абсолютного количества лимфоцитов, снижение массы тела и объема асцитной опухоли, ТРО составляет 47 %. Циклофосфамид в исследуемых дозах незначительно уменьшает опухолевые клетки (слайд 23).

Способ лечения подкожного варианта АОЭ с гликозил-НММ-1 проводился на опухоленосителях согласно с «Методическим рекомендациям по первичному отбору ПО препаратов», (М., 1980) в сопоставлении с циклофосфамидом. Лечение подкожного варианта АОЭ гликозил-НММ-1 проводилась в следующих дозах: 100 мг/кг 1 раз; 50 мг/кг 2 раза; 30 мг/кг 3 раза и 9 мг/кг ежедневно в течение 1-10 дней; циклофосфамид использовался 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. Гликозил-НММ-1 при лечении п/к варианта АОЭ уменьшает массу опухоли, СПЖ увеличивается в 5 раз (81 %), УПЖ – 7 раз (175 дней), ТРО составило 97 %. В опытах с применением циклофосфамида масса п/к опухоли уменьшалась, ТРО составляет 47 %, СПЖ - 45 дней, УПЖ - 45 дней, т.е. в 7 раз меньше, чем у гликозил-НММ-1. Патоморфологические исследования при лечении опухоленосителей АОЭ (диплоидный вариант) с использованием гликозил-НММ-1 и показали, что в структуре внутренних органов наблюдается повреждение опухолевой ткани, т.е. появляются многоядерные клетки и очаги некроза. В клетках опухоли происходят выраженные дегенеративно-дистрофические изменения, приводящие их к гибели и лизису. Следовательно, при способе лечения АОЭ (диплоидный вариант) у животных-опухоленосителей с гликозил-НММ-1 и циклофосфамид соответствуют критериям ПО действия в первичном скрининге по отбору ПО средств (слайд 24).

ВЫВОДЫ

1. Физико-химические свойства субстанции гликозил-НММ-1 соответствуют требованиям ГФ Х1 изд. для сухих лекарственных веществ. Субстанцию получают простым методом синтеза, хорошо растворима в воде.

2. ЛД₅₀ гликозил-НММ-1 при однократном в/б и в/в введениях животным соответственно равняется 1950 и 717 мг/кг, т.е. малотоксичен и по степени токсичности относится к IV классу. При морфологическом исследовании патологические изменения не обнаружены. ЛД₅₀ препарата сравнения - 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 изменяет количества общего белка, уровень липидов, β-липопротеидов сыворотки крови, не влияет на клеточные элементы костного мозга, функцию печени, почек и ЦНС; при микроскопии в желудке наблюдаются дегенеративно-дистрофические изменения; в почках серозное воспаление, дегенерация эпителия канальцев.
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 %; ПОА 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 составляет 97 %. Т.о., гликозил-НММ-1 соответствует критериям ПО действия в первичном скрининге по отбору ПО средств. Циклофосфамид при АОЭ у опухоленосителей выражено снижает лейкоциты, лимфоциты в крови, нестойко угнетает гемопоэз, незначительно уменьшает массу тела, массу и объем опухоли, ТРО составляет 47 %.
5. Гликозил-НММ-1 не обладает местно-раздражающим, кожно-резорбтивным, алергогенным, иммунодепрессивным, кумулятивным, канцерогенным, мутагенным, эмбриотоксическим и тератогенными действиями. Препарату сравнения характерна высокая кумулирующая способность и иммунодепрессивное действие.
6. Изучением фармакокинетики гликозил-НММ-1 в кровотоке установлено, что после введения субстанции через 15 минут в плазме крови определяются следы. Гликозил-НММ-1 близок к производным НАМ по продолжительности циркуляции в крови, которая у циклофосфамида равна 6 часам.
7. Способ лечения с гликозил-НММ-1 асцитного и подкожного вариантов АОЭ у животных-опухоленосителей показал, что субстанция обладает выраженным ПО действием, превосходящим по активности препарат сравнения. Преимуществами гликозил-НММ-1 являются высокая ПОА при АОЭ (диплоидный вариант) - 93 и 97 %, УПЖ - 175 дней, не вызывает лейкопению, обладает избирательными свойствами и проникающей способностью через ГЭБ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Субстанция гликозил-НММ-1 в будущем может оказаться эффективным средством для лечения онкологических заболеваний (лейкозы, лейкемии, АОЭ (диплоидный вариант) и др.). Гликозил-НММ-1 может рекомендоваться в качестве ПО средства после рассмотрения ДЛО и МТ МЗ КР.
2. 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 на изобретение № 1129), используется в учебном процессе и экспериментальных исследованиях по разработке ПО лекарственных средств.
3. Субстанция гликозил-НММ-1 может стать перспективным ПО лекарственным препаратом (слайд 25).

Спасибо за внимание.

Председатель: доклад окончен - 21 мин. У кого есть вопросы соискателю? Пожалуйста, Анара Рустамовна.

Доктор биологических наук Умралина А.Р.

1 вопрос. В качестве препарата сравнения является препарат циклофосфамид, у которого при определении острой токсичности ЛД₅₀ равняется 100 мг/кг, тогда в практических рекомендациях у циклофосфана должно быть одинаковое количество доз ?

Камчибекова Ч.: Уважаемая, Анара Рустамовна, разрешите ответить на Ваши вопросы:

1. В качестве препарата сравнения является препарат циклофосфамид, у которого при определении острой токсичности ЛД₅₀ равняется 100 мг/кг. В практических рекомендациях циклофосфамид рекомендуется 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.

Председатель: Вы удовлетворены ответами соискателя, Анара Рустамовна?

Доктор биологических наук Умралина А.Р. - да, спасибо.

Председатель: у кого есть вопросы соискателю? Пожалуйста, Тамара Семеновна.

Кандидат медицинских наук, доцент Сабирова Т.С.

1 вопрос. Где описаны физико-химические свойства исследуемой субстанции гликозил-НММ-1 имеется метод К. Фишера, и где проводились исследования мутагенных свойств тоже имеется РF – значение р по Фишеру, это разные показатели?

2 вопрос. В 4-м слайде какие единицы обозначения состава субстанции ?

3 вопрос. Почему в клеточных элементах костного мозга отсутствуют ретикулоциты, или Вы их не определяли? Какое количество ретикулоцитов в норме в эритроидном ростке кроветворения?

4 вопрос. Слайд № 16 - написано «показатели оценки функциональной кумуляции». Кумулятивные свойства функциональные или материальные?

Камчибекова Ч.: Уважаемая, Тамара Семеновна, разрешите ответить на Ваши вопросы:

1. Где описаны физико-химические свойства исследуемой субстанции гликозил-НММ-1 метод К.Фишера применяется для определения количественного содержания воды. При статистических исследованиях мутагенных свойств тоже имеется P_F – значение p по Фишеру, это разные показатели.

2. В 4-м слайде единицы обозначения состава субстанции: ксилоза безводная - 15 г; 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; кислота уксусная ледяная - 25 мл.

3. В клеточных элементах костного мозга определяли количество ретикулоцитов. В эритроидном ростке кроветворения количество ретикулоцитов в норме от 0 до 0,4 %.

4. Слайд № 16 - называется «кумулятивные свойства субстанции гликозил-НММ-1».

Председатель: Вы удовлетворены ответами соискателя, Тамара Семеновна?

Кандидат медицинских наук Сабирова Т.С. - да, спасибо.

Председатель: У кого есть вопросы соискателю? Пожалуйста, Чолпон Кенешевна.

Доктор медицинских наук, профессор Чонбашева Ч.К.

1 вопрос. Какой был вес животных до получения асцитной опухоли? Как получали асцитный и подкожные варианты АОЭ у животных? Где получили штаммы АОЭ (диплоидный вариант)? Как определяли специфическую ПОА? Какие животные были контрольными и опытными и какие изменения были до и после лечения? Как определяли массу тела, вес и размеры подкожной опухоли у опухоленосителей?

2 вопрос. Какие морфологические исследования проведены при АОЭ?

3 вопрос. Показать вес опухоли на слайде?

Камчибекова Ч.: уважаемая, Чолпон Кенешевна, разрешите ответить на Ваши вопросы:

1. Нами на линии мышах БАЛБС массой 20-25 г. воспроизводились асцитный и подкожные варианты АОЭ. Штаммы АОЭ (диплоидный вариант) были получены НЦО МЗ КР из Банка-музея РФ, которые являются опухолью высокой степени злокачественности.

Определяли специфическую ПОА на асцитном и подкожном вариантах АОЭ в сравнении с циклофосфамидом. Перевивка опухолевых клеток

проведена в/б и п/к способом 320 мышам. Было 16 групп: I-II - контрольные, III-VIII – опытные группы. До лечения АОЭ увеличивалась. Опухоленосители получали в/б гликозил-НММ-1 в дозах: 40; 20 и 10 мг/кг.

При асцитном первое введение субстанции опухоленосителям проводилось через 24 часа после имплантации опухоли. Измерялась масса тела, анализ периферической крови проводился на 11-й день. Вскрытие опухоленосителей осуществлялось на 12-й день, измерялась масса тела и объем асцитной опухоли, определялось торможение роста опухоли (ТРО) и проводился анализ крови. После лечения с гликозил-НММ-1 снижалось количество лейкоцитов в крови до нормы, ТРО составил 93%, уменьшалась масса тела у опухоленосителей и объем опухоли.

При п/к варианте первое введение субстанции опухоленосителям проводилось на 3-й день после имплантации опухоли. Определялась масса тела и размер опухоли, ТРО, средняя продолжительность жизни (СПЖ) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ) в динамике на 7-й, 14-й и 21-е дни и до вскрытия опухоленосителей. Исследование периферической крови проводилось на 7-й день, после 10-и дневного введения субстанции. Наблюдение проводилось в течение трех месяцев и до полной гибели животных в контроле. Вскрытие животных осуществлялось через 3 месяца. У опухоленосителей, получавших гликозил-НММ-1 в дозах 40; 20 и 10 мг/кг масса (мг) и размеры опухоли (мм), которые измерялись линейкой наружно пальпаторно в динамике на 7-й, 14-й и на 21-й день уменьшились полностью, по сравнению с контролем ($P \leq 0,05$). Гликозил-НММ-1 не уменьшает количество лейкоцитов в крови ниже нормы, СПЖ увеличивалось в 5 раз, УПЖ в 7 раз и ТРО составляло 97 %.

2. При асцитной опухоли проведены цитологические исследования. Материал для исследования получен у интактных-опухоленосителей путем пункционной биопсии брюшной полости на 12-й день, пунктаты наносились на предметные стекла. При анализе препарата выявлены опухолевые клетки, лежащие отдельно в различных положениях. После трансплантации в препаратах контрольной группы наблюдались признаки апоптоза в виде «протуберанцев» цитоплазмы. Опухолевые клетки окрашивались интенсивно. На фоне гликозил-НММ-1 в дозе 40 мг/кг клеточный состав количественно уменьшился. Обнаружены единичные мезотелиальные клетки начальными признаками апоптоза и лизиса. В дозах 20 и 10 мг/кг опухолевые клетки в препаратах уменьшились. Просматривались изредка апоптозные клетки, которые находились в периоде лизиса. При асцитной и п/к опухоли проведены также морфологические исследования внутренних органов: происходит повреждение опухолевой ткани; появляются многоядерные клетки, очаги некроза, выраженные дегенеративно-дистрофические изменения, гибель и лизис

клеток. Вокруг зоны некроза наблюдается разрастание соединительной ткани; расширение кровеносных сосудов.

3. Вес опухоли представлен на слайде № 15 в динамике на 7-й, 14-й и на 21-й день.

Председатель: Вы удовлетворены ответом соискателя, Чолпон Кенешевна?

Доктор медицинских наук, профессор Чонбашева Ч.К. - Да, спасибо.

Председатель: У кого есть вопросы соискателю? Если нет вопросов, кто желает выступить? Пожалуйста, Анара Рустамовна.

Доктор биологических наук Умралина А.Р.

Уважаемые коллеги! Научная работа Камчибековой Ч. выполнена по сравнению с предыдущим докладом на методологическом уровне, отличается построенной логикой исследования. Актуальность выполненной диссертации не вызывает сомнений, т.к. только изучение по созданию новых ПО лекарственных препаратов позволяет выявить все преимущества и недостатки в разработке новых средств. По моему мнению, внимания заслуживает, то, что впервые изучены и установлены параметры специфической ПОА и др. Установлено ПО терапевтическое действие гликозил-НММ-1. По результатам данного исследования должны быть сделаны выводы, которые позволят улучшить разработку новых эффективных и безопасных ПО лекарственных средств. Рекомендуется в «практических рекомендациях» оставить 3 пункта, 1-й и 3-й пункты объединить, и убрать 4-й пункт.

Председатель: У кого есть вопросы соискателю? Вопросов - нет. Выводы - хорошие. Дискуссия закончена. Слово предоставляется научному консультанту член-корр. НАН КР, д.м.н., проф. Зурдинову А. З.

Научный консультант, член-корр. НАН КР, д.м.н., проф. Зурдинов А.З.: по докладу соискателя было много замечаний. Диссертацию привела в порядок. Время, отведенное на доклад составило 27 минут, включая технические погрешности. В слайде № 16 слово «функциональная кумуляция» исправить на «кумулятивные или кумулирующие свойства». Оппоненты определены. Если диссовет поддержит, защиту диссертации можно назначить на 7 июня 2019 г.

Председатель: спасибо, членам Диссертационного совета и научному консультанту член-корр. НАН КР, д.м.н., проф. Зурдинову А. З.

Заключение. Диссертационного совета Д 03.17.558 рассмотрев представленную соискателем Камчибековой Ч. докторскую диссертацию на тему «Разработка нового противоопухолевого лекарственного препарата гликозил-нитрозометилмочевина-1» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология пришла к следующему заключению.

Автореферат диссертации Камчибековой Ч. полностью соответствует содержанию диссертации, поставленной в ней цели и задачам исследования. Автореферат имеет идентичное резюме на кыргызском, русском и английском языках.

Комиссия диссертационного совета предлагает по докторской диссертации Камчибековой Ч. назначить:

- **в качестве ведущей организации** - ВГБОУ высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, где работают доктора медицинских наук по специальности 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология;

- **первым официальным оппонентом** - доктора медицинских наук, профессора Назарбаев Университета Гуляева Александра Евгеньевича (шифр научной специальности 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология), который имеет труды, близкие к проблеме исследования;

- **вторым официальным оппонентом** - доктора медицинских наук, профессора, академика Академии наук Республики Казахстан Рахимова Кайролла Дюсенбаевича (шифр научной специальности 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология), который имеет труды, близкие к проблеме исследования;

- **третьим официальным оппонентом** — доктора медицинских наук, профессора Давлеталиеву Нурилю Емелбековну (шифр научной специальности в диссодете 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология), которая имеет труды, близкие к проблеме исследования.

Диссертационный совет Д 03.17.558 рассмотрев представленные документы, рекомендует диссовету принять к защите диссертацию Камчибековой Ч. на тему «Разработка нового противоопухолевого лекарственного препарата гликозил-нитрозометилмочевина-1» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология.

ПОСТАНОВИЛИ:

Диссертационная работа Камчибековой Ч. на тему «Разработка нового противоопухолевого лекарственного препарата гликозил-нитрозометилмочевина-1» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология представляет собой законченный научный труд, в котором проведены научные исследования, имеющие научно-практическое значение. Согласно высказанным замечаниям и предложениям членов диссовета рекомендовать провести защиту докторской диссертации.

Председатель: ставлю на голосование, кто за то, чтобы рекомендовать на защиту диссертацию Камчибековой Ч. Спасибо.

Председатель: ставлю на голосование, кто за то, чтобы принять данное заключение заседания диссертационного совета Д 03.17.558 и рекомендовать диссертацию Камчибековой Ч. к публичной защите?

Итоги голосования:

«за» - единогласно;

«против» - нет;

«воздержавшихся» - нет.

Председатель: Уважаемые члены диссертационного совета, коллеги. Позвольте на этом считать заседание нашего совета закрытым. Спасибо всем.

**Председатель,
член-корр. НАН КР,
д.вет.н., профессор**



[Handwritten signature]
А.Т. Жунушов

**Ученый секретарь,
к.м.н., доцент**

[Handwritten signature]

Т.С. Сабирова

Подпись	<i>Жунушова А.Т.</i>
Удостоверяю	
Ученый секретарь Института биотехнологии	<i>Берқидасова А.Т.</i>
"16" <i>сентября</i> 2009 г.	
ИНН 02403197110012	