

На правах рукописи

ПАНЧЕНКО
Андрей Владимирович

**НОВЫЙ КЛАСС ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ
ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗНОГО ЛИГНИНА:
ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВ
СОПРОВОДИТЕЛЬНОЙ ХИМИО- И ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Санкт-Петербург, 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, **Анисимов Владимир Николаевич**

Официальные оппоненты: **Орлов Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», директор

Киселева Екатерина Прохоровна, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», заведующая лабораторией иммунорегуляции отдела иммунологии

Бланк Михаил Аркадьевич, доктор медицинских наук, академик РАЕН, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный научный сотрудник

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт онкологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.052.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197759, Санкт-Петербург, Песочный-2, ул. Ленинградская, д. 68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России и на сайте <http://www.niioncologii.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Лариса Валентиновна Филатова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В основе современных подходов к химио- и лучевой терапии больных злокачественными новообразованиями к ведущим принципам противоопухолевой активности относят подавление пролиферации и способности к метастазированию клеток опухоли. При этом практически все химиотерапевтические препараты, виды и режимы лучевого лечения оказывают повреждающее токсическое воздействие на нормальные ткани (Wood et al., 2012), что существенно влияет на качество жизни пациентов. Как правило, в схемах лечения онкологических пациентов лечебная доза как химиотерапевтического, так и лучевого воздействия, весьма близка к максимально переносимой, что сопровождается развитием нежелательных явлений в 50-90% случаев (Кондратьев, 2000; Кондратьев, Карасева, 2000; Семенова, 2009; Телетаева, 2009).

Поэтому конечной целью вспомогательного лечения у таких пациентов является снижение токсичности химиотерапии для здоровых тканей, так как побочные эффекты приводят к увеличению интервалов между циклами химиотерапии или требуют снижения дозы, что ухудшает результаты лечения (Braun, Seymour, 2011). Варианты лечения таких расстройств остаются ограниченными (Ribeiro et al., 2016; You et al., 2016). В идеале лекарства, используемые для устранения токсических эффектов, не должны иметь побочных эффектов сами по себе, особенно при длительном применении, а также не должны уменьшать эффективность лечения. В этом плане одними из многообещающих являются полифенолы растений. Они защищают здоровые ткани, в частности, уменьшают продукцию внутриклеточных активных форм кислорода, но не эффект химиотерапии (Coccia et al., 2016). Антиоксидантные свойства хорошо описаны для флавоноидов (Weiss, Landauer, 2003; Chacko et al., 2010; Mileo, Miccadei, 2016), которые оказывают антиканцерогенное действие (Link et al., 2010; Shirakami et al., 2012) и поэтому перспективны для сопровождения радиотерапии (Özyurt et al., 2014) и химиотерапии (Sahu et al., 2014). Примечательно, что антиоксидантной эффективностью обладают не только полифенолы с низкой молекулярной массой (Coccia et al., 2016), но и гуминовые полифенольные композиции, которые способны защищать макромолекулы, например ДНК, от окислительного повреждения (Slamenová et al., 2000).

Одной из актуальных проблем радиобиологии остается поиск и разработка новых средств профилактики и терапии радиационных поражений. Это связано как с возможными аварийными ситуациями на промышленных объектах, использующих радиационные технологии (атомные электростанции), так и с возросшей террористической угрозой, в т.ч. и радиологической. Только несколько гематопозитических колониестимулирующих факторов разрешены к применению в качестве радиопротекторов по решению Управления по контролю пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) (Singh et al., 2015). Одно из направлений решения этой проблемы – использование малотоксичных веществ биологического происхождения или их аналогов, в том числе комплексных органических соединений металлов переменной валентности, которые могут обладать радиозащитным действием (Miura et al., 1998; Garofalo et al., 2014). В ряде стран (Индия, Китай и др.) антиоксиданты и антиоксидантные комплексы растительного происхождения рассматривают в качестве противолучевых средств ввиду хорошей переносимости при весьма высокой эффективности, доступности и возможности наработки в больших количествах (Arora et al., 2005; Hosseinimehr, 2007). Полифенольные соединения (розмариновая кислота (Xu et al., 2016), ликопен (Gajowik, Dobrzyńska, 2014) и флавоноиды (Гребенюк, Легеза, 2013; Vasin, 2014)) оказывают радиопротекторные эффекты, опосредованные различными механизмами. В качестве радиозащитных средств могут быть использованы индукторы биосинтеза отдельных ферментов антиоксидантных систем, например, металлотioneинов (Cai et al., 1999). Органические лиганды, связанные с ионами металлов, позволяют не только существенно снизить токсичность соединений и улучшить их проникающую способность, но и придают им новые свойства – Mn, Zn или Cu-супероксиддисмутазные активности (Sorenson , 1984; Kostyuk et al., 2004). Молибден, необходимый микроэлемент, участвует в качестве кофактора в ферментах системы детоксикации (Ale-Ebrahim et al., 2015). Один из возможных механизмов действия подобных растительных комплексов полифенольного происхождения может заключаться в способности этих соединений нейтрализовывать свободные радикалы (Kuntić, 2013) и подавлять окисление липидов, индуцированное γ -излучением (Zbikowska et al., 2016).

Лигнин и его производные обладают низкой токсичностью и

широким спектром биологических эффектов. В частности, производные лигнина обладают противовирусным действием (Raghuraman et al., 2007; Andrei et al., 2011), оказывают противовоспалительное (Saluja et al., 2013), антидиабетическое (Bapatre et al., 2015; Hasegawa et al., 2015) и противоопухолевое (Петухов и соавт., 1999; Wang et al., 2015; Bapatre et al., 2016) действие. Кроме того, гидролизный лигнин используется в качестве энтеросорбента. Из растворенных в щелочи лигнинов после получения целлюлозы получают биоразлагаемые и безопасные наночастицы для доставки лекарств, такие как антибактериальные серебряные композиции (Frangville et al., 2012; Richter et al., 2015). Антиоксидантная активность, присущая полифенольным соединениям, считается ведущей в механизме действия соединений, подобных лигнину (Pan et al., 2006; Sun et al., 2014; Qazi et al., 2017). Таким образом, разработка новых лекарственных средств на основе гидролизного лигнина представляется перспективным направлением. Этим определяется актуальность проведенного нами исследования инновационных водорастворимых композиций ВР-С2 («бипи-сидва») и ВР-С3 («бипи-ситри»). В качестве основы в них использованы бензолполикарбоновые кислоты (полифенольные соединения), полученные из нерастворимого гидролизного лигнина при высокотемпературном щелочном гидролизе в присутствии кислорода воздуха. Композиция ВР-С2, разработанная в качестве радиопротектора, включает молибден. Композиция ВР-С3 разработана как средство сопроводительной терапии и геропротектор (Анисимов и соавт., 2014), и включает в состав соединения железа, селена, аскорбиновую кислоту и ретинол.

Степень разработанности темы

Одно из перспективных направлений исследований в области онкологии – поиск способов уменьшения побочных эффектов противоопухолевого лечения. Активно ведутся исследования по возможности использования малотоксичных веществ биологического происхождения, в том числе полифенолов, в качестве потенциальных средств для применения в онкологии. Различные полифенольные соединения растительного происхождения проходят оценку как в экспериментах, так и в клинических исследованиях. К наиболее изученным из них можно отнести женьшень (*Panax spp.*) и его сапонины (Wang et al., 2009),

кроцин и каротиноиды шафрана (*Crocus sativus*) (Assimopoulou et al., 2005), куркумин (Papiež, 2013), кверцетин (Kuhlmann et al., 1998), прополис (смесь сотен полифенолов) (Akyol et al., 2016), ресвератрол (El-Sheikh et al., 2017) и другие.

Лигнины – наименее исследованная группа полифенолов в отношении их химиопрофилактического и химиотерапевтического потенциала (Carocho et al., 2013). Фармакологические эффекты производных лигнинов достаточно широки, в частности, они рассматриваются как средства для лечения диабета (лигносульфоновая кислота), ожирения (лигнофенолы), ВИЧ-инфекции (лигносульфоновая кислота, комплексы лигнин-углеводы), эмфиземы и в качестве антикоагулянтов (сульфатированные низкомолекулярные лигнины) и др. Лигнины рассматриваются также в качестве потенциальных нано-систем доставки лекарств (Vinardell, Mitjans, 2017).

Работ по исследованию производных гидролизного лигнина в качестве средств сопроводительной терапии онкологических пациентов для ускорения естественных процессов восстановления повреждений иммунной, кроветворной и пищеварительной систем, особенностей взаимодействия с химиопрепаратами и лучевым лечением в отечественной и зарубежной литературе практически нет. Это послужило основанием для проведения комплексного исследования полифенольных композиций ВР-С2 и ВР-С3 на основе природного гидролизного лигнина.

Цель исследования

Установить биологическую активность и охарактеризовать безопасность водорастворимых полифенольных композиций, полученных на основе природного гидролизного лигнина и обосновать возможность их применения в качестве инновационных препаратов сопроводительной терапии у онкологических пациентов.

Задачи исследования

1. Определить основные активные компоненты и возможные молекулярные мишени действия полифенольной основы композиций ВР-С2 и ВР-С3 на панели мишеней *in vitro*.
2. Исследовать фармакокинетику полифенольной основы композиций ВР-С2 и ВР-С3 *in vivo*.

3. Определить влияние композиции ВР-С3 на повреждающие эффекты химиотерапевтических препаратов.
4. Оценить эффективность различных схем химиотерапевтического лечения с использованием сопроводительного введения композиции ВР-С3 на онкологических моделях *in vivo*.
5. Выявить и охарактеризовать радиопротекторные свойства композиции ВР-С2 при общем однократном γ -облучении, оценить ее безопасность в опытах на грызунах.
6. Оценить эффекты композиции ВР-С2 при лучевом воздействии на опухоль на моделях *in vivo*.
7. Оценить канцерогенную безопасность длительного применения полифенольной композиции ВР-С3 на основе природного гидролизного лигнина в хроническом опыте у мышей.

Научная новизна исследования

Первые охарактеризован новый класс препаратов на основе полифенольных соединений, полученных из гидролизного лигнина, в качестве средств восстановительной терапии на мелких лабораторных животных-опухоленосителях, получавших химиотерапевтическое или лучевое лечение.

Установлено, что новой композиции ВР-С2 свойственно радиозащитное действие в среднелетальном диапазоне доз при облучении всего тела с фактором изменения дозы 1,1–1,2; изучены механизмы радиомитигирующего действия ВР-С2.

Впервые выявлен защитный эффект композиции ВР-С3 по отношению к токсическому действию цитостатиков, применяемых в клинической практике, проявляющийся без уменьшения их противоопухолевой активности.

Впервые в хроническом опыте у мышей самок SHR проведена оценка канцерогенности композиции ВР-С3. Охарактеризована фармакокинетика полифенольной основы и безопасность композиций ВР-С2 и ВР-С3 при длительном применении в опытах на грызунах.

Теоретическая значимость работы

Результаты исследования расширяют представления о биологических эффектах полифенольных соединений природного происхождения, в частности на основе гидролизного лигнина.

Полученные данные свидетельствуют о высокой степени безопасности исследованных композиций. Выявленное их защитное действие в отношении пищеварительной и кроветворной систем организма при воздействии повреждающих факторов, позволяет рассматривать эти композиции как основу для получения новых молекул с определенным механизмом действия. Получены данные о клеточных мишенях, при взаимодействии с которыми могут реализовываться эффекты производных гидролизного лигнина, а при моделировании *in silico* сформирована база данных по структурным основам веществ, активность которых хорошо сопоставима с биологической активностью на панели мишеней.

Показано, что полифенольный лиганд ВР-Сх-1 может изменять фармакокинетику тяжелых металлов, что открывает новые направления в токсикологических и фармакологических исследованиях.

Полученные данные о способности полифенольных производных гидролизного лигнина уменьшать токсические эффекты ксенобиотиков указывают на перспективность их исследований не только в медицине, но также в ветеринарии, сельском хозяйстве.

Практическая значимость работы

Широкое внедрение предложенного решения позволит расширить арсенал безопасных отечественных средств восстановительной медицины. Указанные средства могут быть использованы у онкологических пациентов, получающих химиотерапевтическое или лучевое лечение, для ускорения естественных регенеративных процессов в организме. Результаты исследования внедрены в практическую деятельность ООО «Нобель» (Россия), для подготовки заявки на получение разрешения на проведение международного многоцентрового рандомизированного двойного слепого клинического исследования ВР-С2 для профилактики радиационно-индуцированных дерматитов у пациенток со злокачественными опухолями наружных половых органов (Фаза 1-2) (акт о внедрении от 27.09.2019).

Предложен оригинальный метод оценки фармакокинетики сложных композиций. Метод заключается в введении тритиевой метки в структуру соединений и позволил выявить различия биодоступности полифенольных соединений на основе

гидролизного лигнина при их внутривенном и пероральном введении. Эти результаты исследования внедрены в образовательную деятельность на Химическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (акт о внедрении №671/104-03 от 27.06.2019).

Композиция ВР-С3, обладающая геропротекторной и антиканцерогенной активностью может быть рекомендована к использованию для профилактики первичных и вторичных новообразований у человека.

Установлено, что композиция ВР-С2 обладает радиопротекторными свойствами в отношении общего облучения в диапазоне среднелетальных доз на двух видах грызунов.

Полученные данные позволяют расширить практическое использование одного из побочных продуктов, получаемого в виде гидролизного лигнина при производстве этанола из древесины.

Положения, выносимые на защиту

1. При системном (внутривенном) введении полифенольных соединений на основе природного гидролизного лигнина (полифенольного лиганда ВР-Сх-1) органами преимущественного накопления являются легкие, печень, почки и селезенка. При пероральном введении полифенольный лиганд характеризуется низкой абсолютной биодоступностью, его концентрации в органах животных на несколько порядков меньше, чем при внутривенном введении.

2. Композиция ВР-С3 уменьшает токсическое действие химиопрепаратов из групп алкилирующих агентов и антиметаболитов в отношении органов гемопоэза и лимфопоэза, а также кишечного эпителия.

3. Композиция ВР-С3 не уменьшает эффективность противоопухолевого лечения различных режимов химиотерапии на моделях опухолевого роста у мышей.

4. Композиция ВР-С2 оказывает противолучевое действие при общем γ -облучении в среднелетальном диапазоне доз. Оптимальная радиозащитная доза для крыс составляет 93,7 мг/кг, величина фактора изменения дозы – 1,2. Оптимальная радиозащитная доза для мышей составляет 81 мг/кг, величина фактора изменения дозы – 1,1.

5. Композиции ВР-С2 и ВР-С3 обладают высокой безопасностью. Длительное применение ВР-С2 и ВР-С3 в широком

диапазоне доз не оказывает токсического воздействия на организм лабораторных мышей и крыс. ВР-СЗ угнетает спонтанный канцерогенез и обладает геропротекторным действием у самок мышей SHR.

Личное участие автора в получении результатов

Автором самостоятельно проведены основные этапы диссертационного исследования – сформулированы цель, задачи, проведено планирование экспериментов на животных и *in vitro* (включая разработку и выбор моделей, характеристику групп, изучаемые параметры), разработаны протоколы исследований, получен ряд экспериментальных данных, проведены обобщение и анализ данных, обоснованы выводы исследования. Автором лично проведена статистическая обработка результатов исследований. Самостоятельно проведен анализ данных отечественной и зарубежной литературы в отношении темы работы.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты диссертационного исследования достоверны и обоснованы, что обеспечивается достаточным объемом материала (в опытах использованы 1105 мышей и 921 крыса), сопоставлением результатов с необходимыми контролями, проверкой гипотез на нескольких моделях, использованием современных методов экспериментальной онкологии, радиобиологии, токсикологии, применением адекватных методов статистического анализа данных.

Результаты работы были представлены в докладах на XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (17–18 марта 2016 г., Москва, Россия), на 42-й конференции Европейского общества радиационных исследований (4–8 сентября 2016 г., г. Амстердам, Голландия), на 22-й конференции по ядерной медицинской обороне - ConRad 2017 (8–11 мая 2017 г., г. Мюнхен, Германия), на III Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2017» (23–24 июня 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), на 3-й летней школе по хемоинформатике (5–7 июля 2017 г., г. Казань, Россия), на заседании ученого совета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (30 октября 2018 г., Санкт-Петербург, Россия), на межфакультетском семинаре МГУ им. М.В. Ломоносова по химии

гуминовых веществ (21 февраля 2019 г., Москва, Россия) и на секции «Перспективы геропротекторов как противораковых средств» V Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2019» (23 июня 2019 г., г. Санкт-Петербург, Россия).

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, ГК 14.740.11.0115 «Разработка методов комплексной биологической оценки новых противоопухолевых, антиканцерогенных и геропротекторных средств на примере препаратов на основе гуминовых кислот» и РНФ, проект 16-15-00142 «Разработка новых препаратов на основе полифенольных соединений в качестве средств восстановительной терапии для онкологических пациентов, получающих химиотерапевтическое или лучевое лечение» на 2016-2018 годы.

По теме диссертационного исследования опубликованы 20 работ, в том числе 15 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов докторских диссертаций. Получен один патент на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, библиографического списка и приложения. Общий объем диссертации составляет 267 страниц с 57 таблицами и 25 рисунками. Список литературы включает 364 источника, в том числе 313 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Органическая основа композиций

Полимер ВР-Сх-1 (бипи-сиикс-один) состоит из бензолполикарбонových кислот (полифенольных соединений), полученных из нерастворимого гидролизного лигнина при высокотемпературном щелочном гидролизе в присутствии кислорода воздуха с последующим выделением и очисткой (Shipov et al., 2016). ВР-Сх-1 используется как несущий лиганд в противоопухолевом препарате платины ВР-С1 (Larsen et al., 2014), в композиции – радиопротекторе ВР-С2 (Панченко и соавт., 2017; Вуков et al., 2018) и в геропротекторной композиции ВР-С3 (Анисимов и соавт., 2014). ВР-Сх-1 является многокомпонентной смесью полифенольных соединений, что обусловлено жидкофазным гидролизом для приготовления водорастворимых производных лигнина. Все использованные в данном исследовании серии продукта соответствовали следующему элементному составу: С 62-67%, Н 3,7-4,8%, О 29-34%, и N 0-0,1%. На протонных и углеродных спектрах ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) обнаруживаются пики, свидетельствующие о присутствии ароматических соединений, которые представляют собой основную часть ВР-Сх-1, и метоксильных групп. Он также содержит карбоксильные и карбонильные группы (Fedoros et al., 2018). Соединениям, содержание которых в составе композиции более 1%, по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии, были приписаны индивидуальные брутто-формулы по данным масс-спектрометрии высокого разрешения ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС ИЦРПФ). Работы по характеристике лиганда были выполнены на базе МГУ имени М.В. Ломоносова и Сколковского института науки и технологий. Всего в составе ВР-Сх-1 были идентифицированы брутто-формулы для 2146 одно- и 1602 двузарядных ионов. В целом ВР-Сх-1 – производное лигнина, использованное в этом исследовании, характеризовалось доминирующим вкладом полифенольных соединений с молекулярной массой от 300 до 1200 Да наряду с наличием низкомолекулярной части алифатического характера (терпеноиды, жирные кислоты) и конденсированных ароматических соединений (флавоноиды).

Композиция ВР-С3

ВР-С3 (бипи-ситри) представляет собой водорастворимую композицию, разработанную совместно ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России и ООО «Нобель» (Санкт-Петербург, Россия, патент RU 2522547) (Анисимов и соавт., 2014). В опытах использовали композицию, которая содержит компоненты в следующем соотношении на сухую массу: ВР-Сх-1 - 99,51%, железо (II) - 0,20%, селен (IV) - 0,002%, аскорбиновая кислота - 0,20% и ретинол - 0,081%. В состав композиции введены микроэлементы и низкие дозы витаминов для коррекции возможного дефицита микроэлементов, связанного с хелатирующими свойствами бензолполикарбонновых кислот и их длительным применением, и дефицита витаминов, возникающего у пациентов, получающих химиотерапевтическое лечение. Для опытов композиция ВР-С3 использовалась в виде 0,5% водного раствора, приготовленного *ex tempore*.

Композиция ВР-С2

ВР-С2 (бипи-сидва; ООО «Нобель», Санкт-Петербург, Россия) представляет собой водорастворимую композицию полимера ВР-Сх-1 с молибденом – незаменимым микроэлементом, который является кофактором ферментов различных систем детоксикации организма млекопитающих (Ale-Ebrahim et al., 2015). Для опытов композиция ВР-С2 использовалась в виде 2% водного раствора субстанции, содержащей 1,5% ВР-Сх-1 и 0,5% молибденокислого аммония. Разработана лекарственная форма в виде 0,7% раствора для перорального применения в ампулах по 5 мл. На основании исследований ее стабильности при температуре $25\pm 3^\circ\text{C}$ в течение 2 лет и при температуре $40\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 6 месяцев рекомендованы условия хранения при комнатной температуре, установлен срок годности в 2 года. В качестве растворителя для приготовления растворов с меньшей концентрацией использовали стерильную воду для инъекций.

Животные

В исследованиях безопасности, фармакокинетики и эффективности были использованы 24 крысы самки и 654 крысы самца Вистар (масса тела 180-200 г), 360 мышей самцов СВА (масса тела 18-22 г), 90 мышей самцов С57BL/6 (масса тела 18-22 г), 36

мышей самок BALB/c (масса тела 18-22 г), 265 мышей самцов и 120 мышей самок SHR (масса тела 25-30 г). Модели опухолевого роста воспроизводили у 243 крыс самцов Вистар массой тела 160-180 г (лимфосаркома Плисса), 105 мышей самцов BALB/c массой тела 25-30 г (карцинома кишечника АКАТОЛ), 39 мышей самцов и 43 мышей самок SHR массой тела 25-30 г (саркомы мягких тканей) и у 47 мышей самок линии FVB, трансгенных по HER-2/neu (аденокарциномы молочных желез).

Животные, поступающие из питомника (питомник лабораторных животных Рапполово, питомник лабораторных животных «Столбовая», Россия), проходили карантин 14 суток. Животных содержали в условиях вивария при 12-часовом цикле свет / темнота при 21 ± 2 °C со средней влажностью 20-50% и свободным доступом к лабораторному корму (ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия) и водопроводной воде.

Протоколы исследования были одобрены локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (выписка №1/179 из протокола № 14 Комитета по этике от 30.10.2018; Санкт-Петербург, Россия).

Модели опухолевого роста

Карцинома толстого кишечника АКАТОЛ. Мышам линии BALB/c вводили клетки опухоли подкожно в зону правого бедра (коллекция опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России). Размороженный штамм опухоли прививали животным-донорам, получали образец опухоли из которого в асептических условиях готовили суспензию в концентрации 10^7 клеток/мл и прививали животным опытных групп в объеме 0,2 мл (Трещалина и соавт., 2012).

Саркомы мягких тканей. Индукцию опухолей проводили у мышей SHR подкожным введением 2 мг бенз(а)пирена (Flucka) в 0,1 мл персикового масла (ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга», Россия) (Vesnushkin et al., 2006).

Опухоли молочных желез. У трансгенных по HER-2/neu мышей-самок линии FVB в возрасте 6 месяцев почти у 100% выявляется одна или несколько аденокарцином молочной железы. Данная модель была апробирована автором и описаны основные ее параметры (Panchenko et al., 2016).

Оценка опухолевого роста. Для пальпируемых узлов в

регистрировали линейные размеры и рассчитывали объем опухолевого узла по формуле (1):

$$V = \frac{A \times B^2}{6} \pi \quad (1),$$

где: V – объем, мм³; A – наибольший диаметр опухолевого узла, мм; B – перпендикулярный ему диаметр, мм.

Эффективность лечения оценивали по показателю торможения роста опухоли (ТРО), рассчитанному по следующей формуле (2):

$$\text{ТРО} = \frac{V_c - V_e}{V_c} 100\% \quad (2),$$

где: V_c – средний объем опухолевых узлов в контрольной группе и V_e – средний объем опухолевых узлов в опытной группе (Трещалина и соавт., 2012).

Дополнительную оценку проводили по критерию аналогичному RECIST. Прогрессирование заболевания было определено как увеличение максимального линейного размера опухоли к концу периода наблюдения (21 сутки) по отношению к его началу (0 сутки) более или равным 20%, а стабилизация заболевания – менее 20%.

Методы лабораторной диагностики

Клинический анализ крови проводили в образцах крови (20-40 мкл), которые были взяты в пробирки с К₃ЭДТА (MiniCollect®; Greiner Bio-One International GmbH, Кремсмюнстер, Австрия) на гематологических анализаторах Mindray BC-2800Vet (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, Шэньчжэнь, Китай) и Mythic 18 фирмы Orphee Geneva (Швейцария).

Количество ядросодержащих клеток костного мозга бедренной кости у животных (мыши и крысы) подсчитывали в камере Горяева, предварительно смешивали 0,02 мл аспирата с 0,4 мл 3% раствора уксусной кислоты (McCulloch, Till, 1960).

Биохимические исследования проводили на анализаторе Konelab 20 (Финляндия) с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкциями производителя.

Оценку антиоксидантной активности *in vivo* проводили в лизате эритроцитов самцов мышей линии BALB/c. В исследование включены группа интактных мышей (n=12), группа контроля (n=12), получавшая стерильный физиологический раствор внутривентрально в течение 5 дней и с 1 по 8 сутки питьевую воду интрагастрально зондом (0,1 мл на 10 г массы тела), группа животных (n=12), получавших 5-фторурацил (внутрибрюшинно, 50 мг/кг с 1 по 5-й

дни) и с 1 по 8 сутки питьевую воду интрагастрально (0,1 мл на 10 г массы тела), а также группа животных (n=12), которым вводили 5-фторурацил (внутрибрюшинно, 50 мг/кг с 1 по 5-й дни) и с 1 по 8 сутки ВР-СЗ в дозе 80 мг/кг интрагастрально (0,1 мл раствора на 10 г массы тела).

Определение общей пероксид-разрушающей активности проводили по методу Королюк и соавт. (1988). Определение супероксиддисмутазной активности (СОД) проводили по модифицированному методу Сироты (1999). Определение малонового диальдегида (МДА) проводили в реакции образования ТБК-продуктов по методу Владимиров и Арчакова (1972).

Патоморфологические методы исследования

Все павшие и подвергнутые эвтаназии животные подвергались патоморфологическим исследованиям в объеме, соответствующем задачам опыта, включая аутопсию с макроскопическим описанием, гистологическое исследование тканей и органов. Выполняли рутинную гистологическую проводку в растворе «Изопреп» (ООО «Эргопродакшн», Санкт-Петербург, Россия), ткани заливали в парафиновую среду «Гистомикс Экстра» (ООО «Эргопродакшн», Санкт-Петербург, Россия). Готовили срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином Майера и эозином (красители производства ООО «Эргопродакшн», Санкт-Петербург, Россия), обезвоживали, покрывали покровным стеклом с использованием монтажной синтетической среды и изучали с помощью светового микроскопа. Использовали гистологическую классификацию опухолей, предложенную МАИР (Turusov, Mohr, 1990; Turusov, Mohr, 1994).

Для оценки органоспецифического токсического действия определяли соотношения массы органа и массы тела у животных. При вскрытии органы иссекали без прилежащих тканей и взвешивали на весах Sartorius Research R 160 P (Sartorius AG, Геттинген, Германия). Рассчитывали соотношение масса органа (мг) / масса тела (мг) и умножали на 10, полученные значения усредняли на группу (Миронов и соавт., 2012).

Для оценки энтеротоксического действия изучали морфологию крипт тонкого кишечника. Выживаемость кишечных крипт оценивали по методике Withers и Elkind (1970), рассчитывали среднее количество выживших крипт для каждой

экспериментальной группы.

Радиобиологические методы исследования

Для моделирования различных по тяжести форм острого радиационного поражения (ОРП) животных подвергали общему относительно равномерному воздействию гамма-квантами на установке «ИГУР-1» (^{137}Cs) при мощности дозы 1,01 Гр/мин. Животных контрольных и опытных групп подвергали воздействию ионизирующего излучения одновременно. Дозы облучения варьировали от 4,0 Гр до 8,0 Гр. Во время облучения животные не подвергали седации или анестезии, после облучения не вводили вспомогательных средств.

Локальное облучение опухоли проводили с использованием комплекса лучевой терапии в ФГБУ «ПИАФ им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт» на базе ускорителя СЦ-1000 протонами с энергией 1000 МэВ стереотаксическим методом, поглощённая доза 10 Гр.

Для оценки характера течения и исхода ОРП проводили вычисление показателя выживаемости и средней продолжительности жизни (СПЖ). Значение показателя выживаемости (N, %) вычисляли по формуле (3):

$$N = A/B \times 100 \quad (3),$$

где: A – количество животных, выживших к 30-м суткам, абс. ед.; B – общее количество животных в группе, абс. ед.

Значение СПЖ определяли по формуле (4):

$$\text{СПЖ} = (t_1 + t_2 + \dots + t_i) / i \quad (4),$$

где: СПЖ – средняя продолжительность жизни, сут; t_1, t_2, \dots, t_i – продолжительность жизни отдельного животного, сут; i – количество животных в группе, абс. ед.

Был проведен пробит-анализ для расчета летальных доз облучения ЛД_{16/30}, ЛД_{50/30} и ЛД_{84/30}, рассчитывали величину фактора изменения дозы (ФИД) как отношение ЛД_{50/30} в опытной группе и в группе плацебо.

Определение числа сохранивших жизнеспособность гемопоэтических клеток проводили методом эндогенного колониеобразования по количеству выросших на селезенках лабораторных животных колоний через 8-10 суток после облучения (Till, McCulloch, 1961).

Статистическая обработка данных

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали общепринятыми статистическими методами (Юнкеров, Григорьев, 2002). Статистическую обработку данных исследования выполняли с помощью программного обеспечения MS Excel 2015, SPSS 16.0, GraphPad Prism 6.0. Использованы методы описательной статистики, параметрические (критерий Стьюдента) и непараметрические (критерий Манна-Уитни, критерий Гехана–Вилкоксона) критерии для парных сравнений, точный метод Фишера для сравнения частотных показателей. Множественные сравнения трех и более групп проведены с применением дисперсионного анализа – обычного двухстороннего дисперсионного анализа ANOVA с поправкой на множественные сравнения и пост-тестом Туки, тестом Фишера для выборок с наименее значимой разницей (Least Significant Difference) или без них, дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с пост-тестом Данна на множественные сравнения. Анализ выживаемости проводили построением кривых Каплана-Майера с применением логрангового и критерия Мантеля-Кокса. Статистически значимо различающимися считали результаты, для которых р-значение составляло менее 0,05.

Схемы опытов

Поиск молекулярных мишеней

Исследование *in vitro* молекулярных мишеней действия ВР-Сх-1 проводили на панели DiversityProfileP9 (Cerep, Франция). Исследования выполнены на базе Центра высоких технологий «ХимРар». Связывание ВР-Сх-1 (серия X112K14A1) исследовали в максимально возможной концентрации 0,0042% (V/V). Реакции проводили в 384-луночных плашках на автоматизированных рабочих станциях Biomek 384 NX (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) и мультифункционалом приборе для измерения флуоресценции, люминисценции и оптической плотности в плашках Infinite M 1000 PRO (Tecan). Активность оценивали по ингибированию связывания специфического лиганда или ингибированию активности фермента. Все измерения были проведены в двух повторах, после чего данные усреднялись. Результаты представлены как % от контрольного специфического связывания.

Моделирование активности полифенольного лиганда ВР-Сх-1

проводили *in silico*. Использовали базу данных ChEMBL (ver. 22) <https://www.ebi.ac.uk/chembl>. По полученным брутто-формулам для 2146 одно- и 1602 двузарядных ионов в составе ВР-Сх-1 был осуществлен поиск в базе ChEMBL всех возможных структурных формул. Проведено отсеивание фрагментов структур, которые не были обнаружены при анализе методом ЯМР. Для оставшихся (около 27 000) структур осуществлялся поиск записей об активности в базе ChEMBL. Хемоинформационный скрининг был проведен в сотрудничестве с ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» и кафедрой химии МГУ имени М.В. Ломоносова.

Исследование фармакокинетики меченного [³H]-Вр-Сх-1 у мышей BALB/c

Введение тритиевой метки в состав лиганда ВР-Сх-1 осуществлялось по методике, описанной в (Badun et al., 2010; Badun et al., 2012), под руководством доцента Бадун Г.А. на кафедре радиохимии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Подтверждение сохранения свойств препарата получали с помощью эксклюзионной хроматографии по методике, описанной в (Perminova et al., 1998; Badun et al., 2010).

В исследовании использованы 36 мышей самок линии BALB/c (18,5-22,5 г). Меченый лиганд вводили (0,2 мл/мышь) в хвостовую вену или интрагастрально металлическим зондом однократно. Внутривенный путь введения выбран как обеспечивающий максимальную биодоступность. Пероральный путь введения выбран как планируемый для клинического применения. После введения лиганда в соответствующей временной точке мышей подвергали эвтаназии, брали образец цельной крови в вialsу с К₂ЭДТА и внутренние органы. Вialsы взвешивали, рассчитывали массу образца, который растворяли в жидкости Solvable (PerkinElmer) в соответствии с процедурой, рекомендованной изготовителем. Затем весь раствор или его часть смешивали со сцинтилляционным коктейлем UlmaGold (PerkinElmer) и измеряли радиоактивность трития с использованием жидкостного сцинтилляционного спектрометра Tri-Carb 1600 (PerkinElmer).

Рассчитывали радиоактивность D всего органа в мкКи по формуле (5):

$$D = \frac{DPM - BG}{P \times 2220000} (5),$$

где DPM – измеренная радиоактивность, расп/мин, P - доля

препарата, взятая на измерение, BG – фоновое значение, которое составляло от 100 до 200 расп/мин для разных серий препаратов. Для пересчета использовали соотношение $1 \text{ мКи} = 2220000 \text{ расп/мин}$.

Затем рассчитывали радиоактивность органа Do на г ткани по формуле (6):

$$Do = \frac{D}{W} \quad (6),$$

где W - масса органа, г.

Содержание препарата в органе Co в мг/г ткани вычисляли по формуле (7):

$$Co = \frac{Do}{14,2} \quad (7),$$

где $14,2 \text{ мКи/мг}$ - удельная радиоактивность препарата.

Исследование курсовой фармакокинетики ВР-С2, оценка кумулятивной токсичности

Опыты выполнены на 24 крысах-самках линии Вистар, рандомизированно разделенных на 4 группы по 6 животных: группа ВР-С2 (интрагастрально 100 мг/кг в течение 2 недель, перерыв 2 недели, затем в дозе 200 мг/кг в течение двух недель), группа Молибдат аммония (молибдат аммония в дозе 25 или 50 мг/кг для первого и второго курса, соответственно), группа ВР-Сх-1 (лиганд ВР-Сх-1 в дозе 75 или 150 мг/кг, соответственно двум курсам) и группа Контроль (0,9% водный раствор NaCl в том же режиме и объеме). Токсичность ВР-С2 оценивали по массе тела, клиническому и биохимическому анализу крови, данным аутопсии и гистологического исследования печени и почек. Концентрацию молибдена определяли в цельной крови с использованием масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, работающей при среднем разрешении (Thermo Element2, Thermo Scientific). Образцы были подвергнуты микроволновому расщеплению азотной кислотой. Для аналитической валидации использована атомно-абсорбционная спектроскопия в графитовой печи.

Исследование радиозащитной эффективности ВР-С2

Эксперименты проведены на 654 крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г., 360 мышах самцах линии СВА и 90 мышах самцах линии С57ВL/6 весом 18–22 г. Животных подвергали общему относительно равномерному воздействию гамма-излучения на установке «ИГУР-1» в дозах от 4 до 8 Гр, при мощности дозы 1,01 Гр/мин.

Исследовано 3 уровня доз ВР-С2: 1/650, 1/50 и 1/25 от ЛД₁₀

установленной ранее. 1/25 доза от ЛД₁₀ является лимитированной допустимым объемом введения интрагастрально зондом (не более 3 мл/крысу и 0,2 мл / мышь). ВР-С2 (0,67 % водный раствор) вводили интрагастрально 10-тикратно, с интервалом через 1 сутки. Облучение подопытных животных проводили после 5-го введения композиции, т.е. на 9-е сутки после начала опыта. В контрольной группе вводили плацебо в том же объеме и режиме.

У 24 мышей СВА на 10-й день после облучения в ЛД_{50/30}=5,7 Гр проводили оценку эндогенного колониеобразования в селезенке. У мышей линии С57BL/6 проводили оценку механизмов противолучевого действия ВР-С2. Исследование было проведено в соответствии с рекомендуемой моделью (Plett et al., 2012). Мышей рандомизировали на 9 групп (по 10 животных в каждой). Одна группа (контроль) была «ложно-облученной» (животных помещали в пеналы для облучения, но не облучали) и не получала никаких дальнейших воздействий. Восемь других групп были подвергнуты облучению всего тела в дозах 5,0, 6,0, 7,0 и 8,0 Гр, по две группы на дозу. Через двадцать четыре часа после облучения животным из одной из двух групп, облученных равными дозами, вводили ВР-С2 (81,0 мг/кг), а другой – плацебо до конца опыта. На 8-й день после облучения у выживших животных получали образцы селезенки, костного мозга, тощей кишки и крови.

Оценка влияния ВР-С2 на эффективность лучевой терапии

Опыт проводили на 243 крысах Вистар, животным прививали лимфосаркому Плисса и вводили ВР-С2 в эффективной радиозащитной дозе. Облучение всего тела проводилось на установке «ИГУР-1» в дозе 5 Гр. Процедуру прививки опухоли проводили за 7 суток до гамма-облучения.

На 105 мышьях-самцах BALB/c исследовали эффективность локального облучения аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ, которое проводили протонами с энергией 1000 МэВ стереотаксическим методом, поглощённая доза 10 Гр. Включение мышей в группу и облучение проводили при объеме опухолевого узла 0,1-0,5 см³ (нулевой день). ВР-С2 вводили в эффективной радиозащитной дозе (90 мг/кг) интрагастрально зондом в лечебно-профилактическом режиме, начиная за 7 суток до облучения и далее ежедневно до конца опыта, и в лечебном режиме, начиная через 24 часа после облучения и ежедневно до конца эксперимента.

Определение эффективной дозы композиции ВР-С3

Определение эффективной дозы ВР-СЗ проводили на модели миелодепрессии, вызванной циклофосфамидом (300 мг/кг, внутривенно на 0 сутки) у 50 мышей самцов SHR, разделённых на пять групп по 10 животных. ВР-СЗ вводили в дозах 15 мг/кг, 75 мг/кг и 150 мг/кг с -6 по 10 сутки опыта, ежедневно интрагастрально зондом в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела. Активность эффективной дозы ВР-СЗ подтверждали на моделях миелодепрессии, вызванных 5-фторурацилом (5-ФУ, 150 мг/кг, внутривенно, однократно на 0 сутки) и циклофосфамидом (300 мг/кг, внутривенно на 0 сутки) у 70 мышей-самцов SHR. ВР-СЗ вводили в дозе 75 мг/кг с -6 по 10 сутки опыта, ежедневно интрагастрально. В контрольных группах вводили плацебо в том же режиме и объеме, что и ВР-СЗ.

Исследование влияния режима введения композиции ВР-СЗ по лечебной и лечебно-профилактической схеме

Опыт проведен на 105 самцах мышей линии SHR. Животные были рандомизированно разделены на группы (по 21 животному): 1) контроль, 2) 5-ФУ (150 мг/кг однократно внутривенно в день 0); 3) лечебно-профилактический режим ВР-СЗ (80 мг/кг с -7 суток до введения цитостатика и до 11 суток интрагастрально зондом в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела) + 5-ФУ (150 мг/кг внутривенно в день 0); 4) лечебный режим ВР-СЗ (80 мг/кг с 1 суток после введения цитостатика и до 19 суток интрагастрально зондом в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела) + 5-ФУ; 5) контроль с ВР-СЗ (80 мг/кг интрагастрально зондом с -7 суток до 11 суток опыта). В контрольной группе вводили плацебо ежедневно интрагастрально зондом с -7 суток до 11 суток опыта.

Исследование влияния ВР-СЗ на эффективность циклофосфамида на модели сарком мягких тканей у мышей SHR

У мышей SHR индуцировали развитие сарком мягких тканей введением бенз(а)пирена. Через 15 недель животных, у которых развились опухоли диаметром ~5 мм, рандомизировали в одну из четырех разделенных по полу групп (день -1). Контрольным животным (10 самцов, 11 самок) делали внутривенную инъекцию 0,9% раствора NaCl на 0 день и вводили плацебо. Животным в группе 2 (9 самцов, 10 самок) вводили ЦФ (200 мг/кг внутривенно на 0 сутки) и далее плацебо. В группе 3 (10 самцов, 11 самок) животным выполняли инъекцию 0,9% раствора NaCl и вводили ВР-СЗ (75 мг/кг). Группа 4 (10 самцов, 11 самок) получала инъекцию ЦФ и ВР-СЗ. ВР-СЗ или плацебо вводили через

желудочный зонд с 1 суток опыта ежедневно до завершения опыта на 21 день.

Исследование влияния ВР-С3 на эффективность химиотерапевтического лечения на модели спонтанных опухолей молочной железы у мышей, трансгенных по HER-2/neu

Опыт проведен на 47 мышах самках линии FVB, трансгенных по HER-2/neu с несколькими опухолями молочных желез на мышь средним объемом около 500 мм³. Животные были распределены на 7 групп по 6 мышей и контрольную из 5 мышей. Химиотерапию проводили гемцитабином (300 мг/кг внутривентрально на 0 сутки), комбинацией гемцитабина (300 мг/кг внутривентрально на 0 сутки) и цисплатина (3 мг/кг внутривентрально на 0 сутки) и схемой CAF (циклофосфамид 165 мг/кг внутривентрально на 0 сутки, адриамицин 8 мг/кг внутривентрально на 0 сутки и 5-фторурацил 100 мг/кг внутривенно на 0 сутки). Срок наблюдения за животными составил 21 сутки. ВР-С3 вводили в дозе 75 мг/кг интрагастрально зондом с - 6 по 21 сутки.

Оценка безопасности длительного применения ВР-С3

120 аутбредных мышей-самок SHR (питомник лабораторных животных «Рапполово», Россия), возрастом 3 месяца были рандомизированы по весу на две группы по 60 мышей, животные второй группы получали ВР-С3. Навеску ВР-С3 1 г растворяли в 200 мл дистиллированной воды, добавляли 0,5 мл 30% аммиака и выдерживали при 50 °С, в течение 15 мин. Полученный раствор разбавляли в 100-200 раз питьевой водой для получения 0,005-0,01% раствора и давали вместо питьевой воды (среднемесячная кумулятивная доза 300 мг/кг). Проводили наблюдение за животными с целью оценки их состояния и выявления опухолей, каждые 3 месяца у животных анализировали эстральный цикл, подвергая цитологическому исследованию содержимое влагалищных мазков (Кабак, 1968). Регистрировали даты гибели, рассчитывали среднюю продолжительность жизни всех животных и 10% последних выживших мышей (Анисимов и соавт., 2012; Anisimov et al., 2012).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярные мишени действия полифенольной основы композиций ВР-С2 и ВР-С3

При исследовании селективности ВР-Сх-1 на панели 97 ферментов и рецепторов Diversity Profile P9 показано, что в концентрации 0,0042% ВР-Сх-1 существенно (ингибирование >50%) взаимодействует с 24 мишенями (Таблица 1). Для возможных химических структур (около 27 000) осуществлен поиск записей о биологической активности в ChEMBL (ver. 22, <https://www.ebi.ac.uk/chembl>). Всего удалось извлечь 1474 анализа, которые соответствуют 1316 соединениям базы ChEMBL с интерпретируемыми данными активности (Fedoros et al., 2018). Было проведено сопоставление активности этих соединений с активностью Вр-Сх-1, полученной на панели Diversity Profile – P9 (Таблица 1). Затем были построены структурные схемы (скаффолды) веществ, активность которых сопоставима с биологической активностью ВР-Сх-1 и веществ, идентифицированных в базе ChEMBL. Скаффолды подобранных соединений соответствуют производным фурандиртерпенов, тетрациклическим тритерпенам и их предшественникам – фенантроновым структурам, а также таким соединениям, как флавоноиды и простые ароматические соединения.

Анализ молекулярного состава ВР-Сх-1 методом МС ИЦРПФ и последующая идентификация возможных активных компонентов ВР-Сх-1 путем поиска их молекулярных формул *in silico* в базе ChEMBL указывают на то, что его биологическая активность композиций на его основе может быть обусловлена множеством содержащихся в нем полифенольных компонентов: флавоноиды, сапогенины, фенантроны и др. Скрининг мишеней *in vitro* и *in silico* дал не идентичные, но перекрывающиеся списки. Оба метода идентифицировали в качестве мишеней аденозиновые рецепторы А1 (ADORA1) и А2 (ADORA2A), дофаминовый рецептор D4.4 (DRD4), глюкокортикоидный рецептор GR (NR3C1), серотониновый рецептор 5-HT1 (HTR1A), рецепторы простагландина EP2 (PTGER2) и I2 (PTRIG), мускариновый холинергический рецептор CHRМ1 и рецептор ГАМК (GABRA1).

Таблица 1 – Мишени взаимодействия для ВР-Сх-1, определенные на панели Diversity Profile P9

Семейство рецепторов	Мишень	Символьное обозначение белка/семейства белков	Степень ингибирования, %
Аденозиновые рецепторы	A1 (h)	ADORA1	62,1
	A2A (h)	ADORA2A	86,6
	$\alpha 2$	ADRA2A-C	52,2
Адренергические рецепторы	$\beta 1$ (h)	ADRB1	51,5
	$\beta 2$ (h)	ADRB2	71,4
Рецептор γ -аминомасляной кислоты (ГАМК _A)	BZD	GABRA1	53,8
Глутаматные рецепторы	AMPA	GRIA 1-4	90,9
	Kainate	GRIK 1-5	84,3
Брадикининовые рецепторы	B1 (h)	BDKRB1	76,7
Дофаминовые рецепторы	D4.4 (h)	DRD4	62,7
Гистаминовые рецепторы	H1 (h)	HRH1	57,6
Холинергические рецепторы	$\alpha 4\beta 2$ (h)	CHRN2, CHRNA4	73,5
	M	CHRM1-5	96,3
Вазопрессиновые рецепторы	V2 (h)	AVPR2	69,8
	V1a (h)	AVPR1A	56,4
Ионные каналы	KATP	KCNJ	50,3
Транспортеры	GABA	SLC6A1	71,5
Рецептор к тироид-стимулирующему гормону	TRH1 (h)	TSHR	68,8
Глюкокортикоидный рецептор	GR (h)	NR3C1	63,2
Серотониновый рецептор	5-HT1	HTR1 A,B,D,E,F	81
Пуринергические рецепторы	P2X	P2RX1-7	64
	P2Y	P2RY1,2,4,6,11-14	52,6
Простаноидные рецепторы	EP2 (h)	PTGER2	52,4
	IP (PGI2)	PTGIR	68,7

Исследование распределения меченого [³H]-Вр-Сх-1 у мышей BALB/c

При системном введении [³H]-Вр-Сх-1 органами преимущественного накопления являются легкие (2400–5000 мкг/г), печень, почки и селезенка (50-400 мкг/г). Тимус и яичники накапливают от 16 до 116 мкг/г, сердце и головной мозг – от 3,7 до 6,3 мкг/г (Таблица 2). Средняя концентрация лиганда в крови составила от 26 до 155 мкг/г крови, с T_{max} около 6 часов. После достижения максимальной концентрации, уровень содержания

лиганда в крови снижается с $T_{1/2}$ около 6 часов. Площадь под кинетической кривой за 6 часов $AUC_{0-6} = 47204,7$ мкг×мин/г.

Таблица 2 – Среднее содержание органического лиганда в органах после внутривенного введения дозы 100 мг/кг у самок мышей BALB/c (мкг/г ткани) в зависимости от времени после введения

Орган	Время после введения, мин					
	7	30	60	114	369	716
Легкие	2367±153	2367±115	4300±265	4867±503	3400±200	5000±854
Печень	397±45	367±31	230±104	253±55	220±44	170±20
Почки	233±51	207±15	180±173	343±170	227±58	293±57
Селезенка	233±91	153±15	80±44	73±15	47±15	57±15
Кровь	26±10	32±5	91±10	72±5	155±29	86±31
Тимус	24±5	16±1	28±2	24±6	26±3	27±12
Яичники	42±3	41±8	63±2	64±1	48±8	116±46
Сердце	5,4±0,7	5,3±2,0	3,9±1,4	5,3±0,8	4,2±1,1	4,2±1,6
Головной мозг	3,9±0,7	3,7±0,0	5,9±0,8	4,9±0,4	6,3±0,8	4,9±0,9

Примечание – Данные представлены в виде среднего значения и СКО.

После перорального введения (Таблица 3) средняя концентрация лиганда в крови составляла от 1,3 до 2,7 мкг/г с $T_{max} = 2$ часа и наблюдалось постепенное ее снижение с $T_{1/2}$ 22-24 часа. Площадь под кинетической кривой за 6 часов $AUC_{0-6} = 731,5$ мкг×мин/г. При пероральном введении концентрации в органах животных были на несколько порядков меньше – от 2,1 до 17,7 мкг/г в печени и почках, от 0,01 до 7,3 мкг/г в остальных органах, включая головной мозг (Таблица 3).

Максимальное содержание ВР-Сх-1 после внутривенного введения было обнаружено в легких, что может быть связано с его агрегацией и задержкой в капиллярах, о чем свидетельствует интенсивное коричневое окрашивание легочной ткани. При пероральном введении подобная картина не наблюдалась и содержание в легких было сопоставимо с другими органами.

Таким образом, при пероральном введении органический лиганд характеризуется низкой абсолютной биодоступностью (около 1,5%,

определено по соотношению AUC при внесистемном и системном введении).

Таблица 3 – Среднее содержание органического лиганда в органах после перорального введения дозы 100 мг/кг у самок мышей BALB/c (мкг/г ткани) в зависимости от времени после введения

Орган	Время после введения, мин					
	29	60	120	375	1440	2880
Печень	2,10±0,30	3,37±0,90	16,13±22,29	5,80±0,35	4,67±2,40	5,73±3,15
Почки	2,50±0,26	2,53±0,38	17,73±26,65	4,60±0,79	3,83±1,27	4,00±1,87
Головной мозг	2,10±0,17	1,93±0,42	1,30±0,56	1,73±0,40	1,07±0,45	0,97±0,38
Селезенка	1,97±0,21	2,00±0,36	4,33±5,53	1,87±0,42	1,27±0,55	1,20±0,61
Тимус	1,73±0,32	1,77±0,45	7,33±11,06	1,83±0,50	1,13±0,47	0,93±0,49
Кровь	1,50±0,17	1,63±0,45	2,70±3,21	1,87±0,29	1,33±0,70	1,33±0,59
Легкие	0,73±0,61	1,37±0,87	2,80±3,14	1,73±1,67	1,20±1,56	0,70±0,53
Яичники	0,47±0,55	0,58±0,32	1,03±1,44	1,17±0,21	0,53±0,40	0,77±0,38
Сердце	0,008±0,004	0,045±0,043	0,16±0,251	0,077±0,047	0,041±0,039	0,06±0,04
Примечание – Данные представлены в виде среднего значения и СКО.						

Курсовая фармакокинетика ВР-С2, оценка кумулятивной токсичности

Животные получили кумулятивную дозу ВР-С2 4200 мг/кг. При внутривенном введении суточной дозы ВР-С2 100 мг/кг стационарная концентрация (~1000 мкг Мо/л) устанавливалась на 10-12 день (Рисунок 1). Для второго курса введения дозы ВР-С2 200 мг/кг в сутки, наблюдалось увеличение как равновесной концентрации Мо (~4000 мкг Мо/л с остаточным уровнем от первого курса ~300 мкг Мо/л) так и времени ее достижения (12-13 дней) (Рисунок 1). Кинетика элиминации молибдена описывается с помощью двухкомpartmentной модели ($t_{1/2\beta 1} \approx 7$ дней, $t_{1/2\beta 2} \approx 9$ дней).

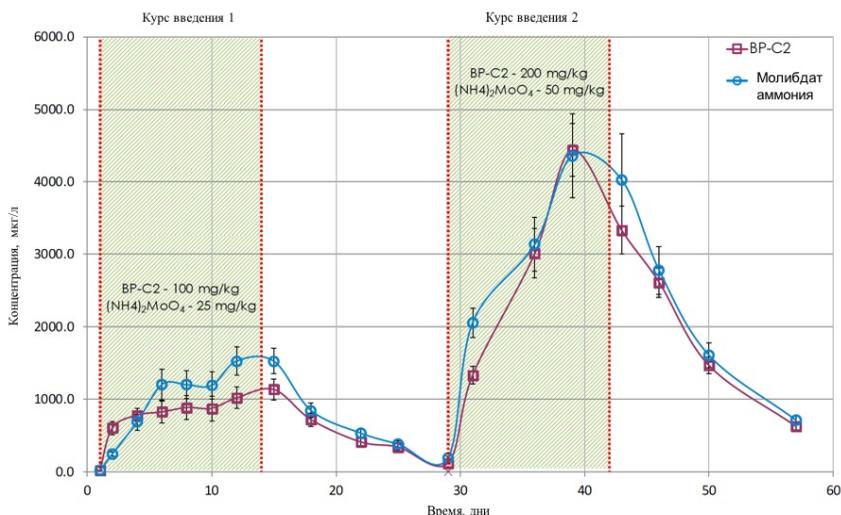


Рисунок 1 – Фармакокинетические кривые курсового введения BP-C2 и молибдата аммония у крыс-самок линии Вистар

Ранее в наших исследованиях были получены данные о фармакокинетике Pt-содержащего препарата с лигандом BP-Cx-1 и цисплатина у мышей с опухолью Эрлиха (Solovyev et al., 2017). Было показано, что полифенольный лиганд значительно изменяет распределение Pt. Изменения фармакокинетики Pt сопровождалось уменьшением токсичности. При оценке двух лекарственных форм Pt-препарата с лигандом BP-Cx-1 было показано, что их фармакокинетика и распределение в тканях пропорциональны вводимым дозам (Navolotskii et al., 2015). Однако, отсутствие стационарной концентрации молибдена и дозовой зависимости при введении более высокой дозы BP-C2 позволяет предположить появление изменений в пути элиминации молибдена. Субхроническое воздействие повышенных доз BP-C2 и достигнутые высокие концентрации молибдена в крови животных не были ассоциированы с токсическим действием. При гистологическом исследовании печени и почек структурных отличий ткани органов между опытной и контрольной группами животных выявлено не было. Содержание эритроцитов и лейкоцитов в крови после окончания 2-го курса введения BP-C2 статистически значимо не отличалось от показателя контрольной группы. Из изученных биохимических показателей крови у крыс, получавших BP-C2,

наблюдалось увеличение активности только лактатдегидрогеназы (Таблица 4).

Таблица 4 – Показатели клинического и биохимического анализа крови разных групп крыс-самок линии Вистар в конце второго курса перорального введения ВР-С2

Показатель	Контроль	ВР-Сх-1	ВР-С2	(NH ₄) ₂ MoO ₄
Клинический анализ крови				
Эритроциты, ×10 ¹² /л	8,8±0,3	8,1±0,3	8,6±0,1	8,9±0,1
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	13,8±3,7	9,4±2,8	13,3±1,2	12,4±4,1
Биохимический анализ крови				
Альбумин, г/л	41,6±1,3	35,2±8,7	39,9±3,5	45,3±5,0
АЛТ, Ед/л	259,8±40,8	191,4±40,9	196,7±43,2	280,5±56,6
АСТ, Ед/л	333,7±144,5	179,7±14,3	217,6±17,1	436,6±166,3
Гамма-глутамилтрансфераза, Ед/л	9,61±3,43	5,71±0,53	4,13±1,74	4,75±0,97
Лактатдегидрогеназа, Ед/л	821±300	760±225	2372±235 *#	1996±655
Щелочная фосфатаза, Ед/л	333,2±69,5	238,5±29,1	316,6±44,9	274,6±35,4
Креатинин, мкмоль/л	35,26±8,91	34,83±12,59	35,38±12,87	36,96±6,22
Амилаза, Ед/л	1204±118	1170±246	1165±64	1274±150
Глюкоза, ммоль/л	5,16±0,64	5,36±0,67	5,85±0,12	5,21±0,47
Кальций, ммоль/л	6,30±0,17	5,91±0,74	5,84±0,32	6,15±0,20
Мочевая кислота, мкмоль/л	101,9±22,8	92,8±12,8	135,6±29,1	124,2±9,0
Мочевина, ммоль/л	7,16±0,49	6,10±1,25	6,77±0,94	6,13±0,73
Фосфор, ммоль/л	1,41±0,41	1,29±0,13	1,38±0,11	1,23±0,06
Триглицериды, ммоль/л	0,96±0,20	1,40±0,83	2,08±0,97	1,33±0,49
Холестерин, ммоль/л	2,30±0,19	1,69±0,48	1,84±0,34	1,85±0,49
Примечание – Статистически значимые отличия: * – p<0,05 от контрольной группы, # – p<0,05 от группы ВР-Сх-1 (n=3 в каждой группе).				

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о безопасности композиции ВР-С2 при введении курсами по 2 недели.

Радиозащитная эффективность композиции ВР-С2

Композиция ВР-С2 при однократном внутрижелудочном введении крысам обладала хорошей переносимостью, величины летальных доз (ЛД) ВР-С2 составляют: ЛД₁₀ – 2,9 ± 0,6 г/кг; ЛД₅₀ – 5,6 ± 0,7 г/кг; ЛД₉₉ – 8,7 ± 0,6 г/кг, что позволяет отнести ее к классу малоопасных веществ (по ГОСТ 12.1.007-76). Далее у крыс испытывали дозы 1/30; 1/60 и 1/1000 от ЛД₁₀.

Композиция оказывает выраженное противолучевое действие при остром радиационном поражении в диапазоне среднелетальных доз (4–6 Гр). Прослеживается дозозависимое противолучевое

действие ВР-С2, так как с увеличением вводимой дозы композиции наблюдали усиление противолучевого эффекта. Наилучший эффект отмечали при введении ВР-С2 в дозе 93,7 мг/кг. При применении композиции в этой дозе у крыс, облученных гамма-квантами в дозе 4,0 Гр, выживаемость увеличивалась на 25 %, а величина СПЖ более чем на 4 суток. При облучении в дозе 5,0 Гр выживаемость увеличивалась на 41,7 %, а величина СПЖ на 6,1 суток. Защитное действие композиции выявлено и при облучении крыс в дозе 6,0 Гр. При этом выживаемость животных увеличилась на 50 %, а величина СПЖ на 8,4 суток.

В группе «Контроль» величины ЛД_{16/30}; ЛД_{50/30}; ЛД_{84/30} составляют 3,9; 5,0 и 6,0 Гр, соответственно. Значение аналогичных смертельных доз при пероральном введении ВР-С2 в дозе 93,7 мг/кг принимают значения 5,5; 6,1 и 6,7 Гр. Величина ФИД при введении композиции ВР-С2 при гамма-облучении крыс составила 6,1/5,0=1,2 (Рисунок 2).

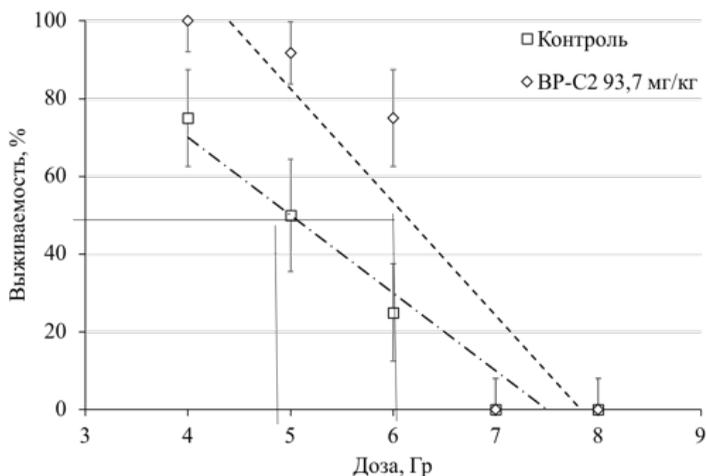


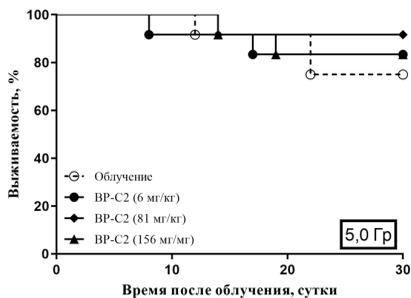
Рисунок 2 – Зависимость выживаемости крыс от дозы γ -облучения в опыте с 10-ти кратным пероральным введением композиции ВР-С2 (n = 12 в каждой группе)

При изучении гемопоэза облученных крыс выявлено, что на 3-е сутки после облучения количество миелокариоцитов в костном мозге крыс, облученных в дозе 5 Гр уменьшилось в 7 раз и составило

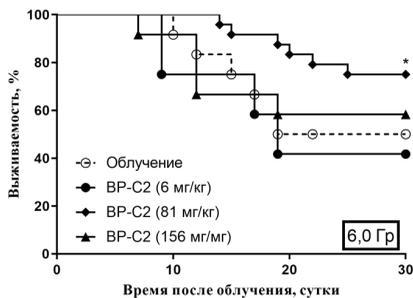
$22,4 \pm 1,0 \times 10^9/\text{л}$. К 10-м суткам количество миелокариоцитов достоверно не изменялось ($21,8 \pm 1,5 \times 10^9/\text{л}$), а к 14-м суткам наблюдали постепенное улучшение гемопоэза ($36,2 \times 10^9/\text{л}$). Введение ВР-С2 способствовало сохранению миелокариоцитов в костном мозге крыс, на 3 сутки их было в 1,3 раза больше, чем в контрольной группе. У облученных животных, получавших ВР-С2, количество миелокариоцитов на 10-е и 14-е сутки достоверно превышало показатели облученной контрольной группы и составило $28,8 \pm 1,2$ и $48,6 \pm 1,8 \times 10^9/\text{л}$, соответственно, однако оставалось ниже уровня аналогичного показателя в группе интактного биологического контроля ($162,0 \pm 1,8 \times 10^9/\text{л}$).

ВР-С2 продемонстрировал наиболее выраженный радиозащитный эффект у облученных мышей линии СВА при введении в дозе 81 мг/кг и был более эффективным в диапазоне средне-летальных доз облучения. ВР-С2 увеличивал выживаемость животных, подвергшихся воздействию в дозах 5,0 Гр и 6,0 Гр на 16,7% и 25,0%, соответственно. При облучении всего тела в дозе 5,0 Гр (Рисунок 3А) не наблюдалось значительных изменений выживаемости в группах, получавших ВР-С2, по сравнению с группой, получавшей плацебо. При воздействии в дозе 6,0 Гр (Рисунок 3Б) введение ВР-С2 в дозе 81 мг/кг привело к статистически значимому увеличению выживаемости. При облучении в дозе 7,0 Гр (Рисунок 3В) различия в выживаемости между группой плацебо (выживаемость 0%) и экспериментальными группами, получавшими ВР-С2 в дозах 6, 81 и 156 мг/кг, не были статистически значимыми и составляли 4,2, 4,2 и 8,3%, соответственно.

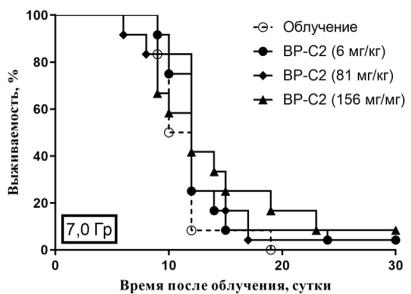
Эти результаты были использованы для расчета летальных доз облучения, которые в группе плацебо составляют 4,6; 5,7 и 6,8 Гр, соответственно для ЛД_{16/30}; ЛД_{50/30}; ЛД_{84/30}. Значение аналогичных смертельных доз при пероральном введении ВР-С2 мышам в дозе 81 мг/кг принимают значения 5,4; 6,2 и 7,1 Гр. Таким образом, ВР-С2 при в дозе 81 мг/кг обеспечивала ФИД=6,2/5,7=1,1 при облучении мышей СВА.



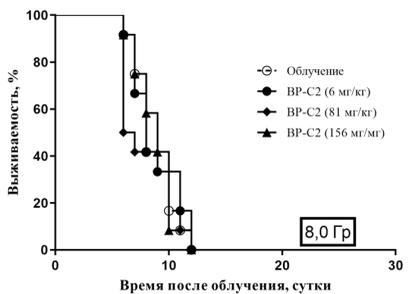
А



Б



В



Г

Рисунок 3 – Кривые выживаемости мышей СВА после однократного общего облучения и введения разных доз ВР-С2

На 10-е сутки после облучения при введении плацебо средние значения массы селезенки составили $27,1 \pm 0,8$ мг, а количества КОЕс – $5,4 \pm 0,1$. Эти показатели были выше у животных, получавших ВР-С2 – $56,2 \pm 1,0$ мг ($p < 0,0001$) и $8,7 \pm 0,2$ ($p < 0,0001$), соответственно. Доза 81 мг/кг была выбрана в качестве оптимальной для последующего краткосрочного эксперимента, в котором механизмы действия и эффективность ВР-С2 были оценены на мышах линии С57ВL/6.

На 8 день в группах мышей линии С57ВL/6, облученных в дозах 5,0, 6,0, 7,0 и 8,0 Гр и получавших плацебо, выживаемость животных составляла 100, 60, 10 и 0%. Выживаемость облученных мышей С57ВL/6, получавших через 24 часа после облучения ВР-С2 в дозе 81,0 мг/кг, составила 100, 50, 50 и 10% при 5,0, 6,0, 7,0 и 8,0 Гр, соответственно. На 8 сутки после облучения число миелокариоцитов костного мозга у облученных животных было значительно снижено,

различия между группами плацебо и ВР-С2 не были статистически значимыми. Масса селезенки у ложнооблученных животных составила $94,0 \pm 36,7$ мг, тогда как у животных, облученных при 5,0-8,0 Гр, она уменьшилась в 2,5–3,4 раза. Различия в изменении массы селезенки между группой ВР-С2 и группой плацебо не достигли уровня статистической значимости. В то же время количество КОЕс при облучении в дозе 5,0 Гр составило $2,3 \pm 0,7$ в группе плацебо и $6,7 \pm 1,6$ в группе ВР-С2 ($p=0,02$), а при облучении в дозе 6,0 Гр – $2,0 \pm 0,8$ и $3,6 \pm 1,4$, соответственно. После облучения в дозе 5,0 Гр число жизнеспособных кишечных крипт в группах ВР-С2 и плацебо составило $133,7 \pm 1,9$ и $124,2 \pm 1,5$ ($p < 0,01$), соответственно. При дозе облучения 6,0 Гр ВР-С2 также увеличивал количество жизнеспособных крипт ($122,2 \pm 1,4$ против $106,2 \pm 1,8$ в группе плацебо, $p < 0,0001$). При окраске антителами к Lgr5 выявлены позитивные клетки, количество которых снижалось по мере увеличения дозы облучения от 5,0 Гр до 8,0 Гр, при этом в группах, получавших ВР-С2, их число было больше, чем в соответствующей группе Плацебо (Рисунок 4).

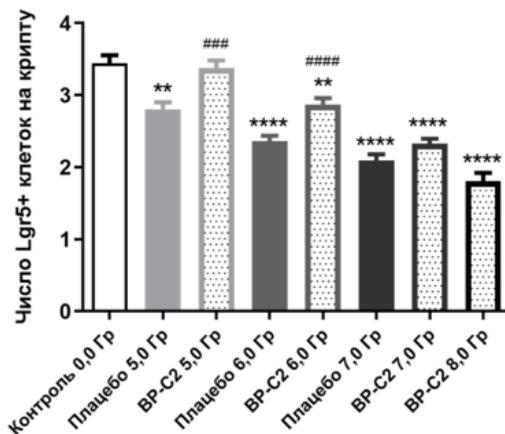


Рисунок 4 – Количество Lgr5+ клеток крипт тощей кишки у мышей C57BL/6 на 8 сутки после облучения всего тела.

** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$ по сравнению с контролем. ### – $p < 0,001$, ##### – $p < 0,0001$ при сравнении групп ВР-С2 и Плацебо

Оценка влияния ВР-С2 на противоопухолевое действие лучевой терапии

В опыте на крысах-самцах линии Вистар с привитой в правое бедро лимфосаркомой Плисса выявлено, что у облучение оказывало противоопухолевое действие. Так, средний объем опухоли у необлученных животных составил на 4 сутки $24,5 \pm 2,7 \text{ см}^3$, на 7 сутки $61,8 \pm 3,9 \text{ см}^3$, а у облученных животных - $10,0 \pm 1,2 \text{ см}^3$ ($p < 0,001$) и $34,6 \pm 3,1 \text{ см}^3$ ($p < 0,0001$) на 4 и 7 сутки после облучения, соответственно. В группе облученных животных с опухолью, получавших ВР-С2, средний объем опухоли достоверно не отличался от животных, не получавших композицию, но было несколько ниже - $14,6 \pm 2,7 \text{ см}^3$ и $39,0 \pm 4,4 \text{ см}^3$, на 4 и 7 сутки, соответственно. При оценке показателей периферической крови животных выявлено, что у животных с лимфосаркомой Плисса наблюдалось развитие умеренного лейкоцитоза в 1,1 – 1,5 раза по сравнению с интактным контролем на разных сроках наблюдения. Облучение крыс с перевитой опухолью приводило к снижению числа лейкоцитов. Введение ВР-С2 у крыс с опухолью сопровождалось меньшим уровнем лейкопении на 4 сутки после облучения ($9,1 \pm 0,7 \times 10^9/\text{л}$) по сравнению с облученными крысами с лимфосаркомой Плисса ($3,8 \pm 0,4 \times 10^9/\text{л}$). Однако, в более поздние сроки количество лейкоцитов в группах облучения с опухолью, включая получавшую ВР-С2, продолжало снижаться, что, вероятно, наряду с ростом опухоли послужило причиной более быстрой гибели животных. Масса тела животных с опухолью увеличивалась пропорционально срокам исследования и превышала значения интактных крыс, что связано с увеличением размеров самой опухоли. Облучение таких животных не приводило к резкому снижению их веса, а введение композиции ВР-С2 оказывало защитный эффект.

В опыте у мышей BALB/c аденокарциномой АКАТОЛ оценивали эффективность локального облучению протонами с энергией 1000 МэВ, поглощенная доза 10 Гр. Средняя продолжительность жизни мышей BALB/c с аденокарциномой АКАТОЛ составила $49,2 \pm 4,8$ суток, а в группе с локальным облучением – $64,3 \pm 6,6$ суток ($p = 0,093$). В группе АКАТОЛ + ВР-С2 средняя продолжительность жизни мышей составила $43,5 \pm 4,2$ суток. В группах АКАТОЛ + Облучение с введением ВР-С2 по лечебной схеме СПЖ = $51,7 \pm 5,3$ суток, а с введением ВР-С2 по лечебно-профилактической схеме СПЖ = $54,0 \pm 3,8$ суток. Включение в схему

лучевой терапии композиции ВР-С2 как при лечебной, так и при лечебно-профилактической схемах применения, приводило к некоторому снижению эффективности противоопухолевого воздействия. Аналогичные данные были получены при анализе динамики объема опухолевого узла (Таблица 5).

Таблица 5 – Размеры первичного опухолевого узла (см³) в различные сроки опыта у мышей BALB/c с аденокарциномой АКАТОЛ при локальном облучении и применении ВР-С2

Группа	Сутки опыта				
	0	5	15	30	45
АКАТОЛ	0,26 ± 0,04	1,87 ± 0,41	4,74 ± 0,38	6,95 ± 0,51	8,43 ± 0,97
АКАТОЛ + Облучение	0,27 ± 0,03	0,71 ± 0,27 * (62%)	3,26 ± 0,41 * (31%)	5,69 ± 0,61 * (18%)	7,73 ± 0,50 (8%)
АКАТОЛ + ВР-С2	0,28 ± 0,04	1,85 ± 0,31 (1%)	4,43 ± 0,31 (7%)	6,00 ± 0,74 (14%)	8,38 ± 0,85 (1%)
АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛП)	0,25 ± 0,03	1,37 ± 0,24 (27%)	4,36 ± 0,42 (8%)	6,22 ± 0,44 (11%)	8,24 ± 0,71 (2%)
АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛПП)	0,25 ± 0,03	1,86 ± 0,37 (0%)	4,57 ± 0,41 (4%)	5,68 ± 0,66 (18%)	8,62 ± 0,66
Примечания					
1 В скобках указано торможение роста опухоли по отношению к группе АКАТОЛ.					
2 * – p<0,05 по сравнению с группой АКАТОЛ					
3 ЛП – лечебный режим применения через 24 часа после облучения, ЛПП – лечебно-профилактический режим применения начиная за 7 суток до облучения.					

Гематологический анализ подтвердил отсутствие выраженного системного действия используемого метода лучевой терапии (данные не представлены). Оценка содержания в крови мышей с развивающейся опухолью уровня интерлейкина-1β – маркера интенсивности воспалительных процессов в организме, показал существенное увеличение этого показателя при развитии новообразования, усугубляющееся лучевой терапией (Таблица 6). Показано выраженное уменьшение продукции ИЛ-1β при применении радиопротекторной композиции ВР-С2, более значимое при использовании его в лечебно-профилактическом режиме.

Таблица 6 – Содержание интерлейкина-1 β (нг/мл) на 10 и 20 сутки в крови мышей BALB/c с аденокарциномой АКАТОЛ при локальном облучении и применении ВР-С2

Сутки	Интактный контроль	АКАТОЛ	АКАТОЛ + Облучение	АКАТОЛ + ВР-С2	АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛП)	АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛПП)
10	105,0 \pm 12,4	149,1 \pm 26,3	216,8 \pm 50,1 *	141,4 \pm 21,2	139,8 \pm 24,7	133,0 \pm 22,8
20		205,7 \pm 34,5 *	210,7 \pm 19,5 *	182,0 \pm 13,1 *	159,7 \pm 33,3	127,9 \pm 21,4 #
Примечания						
1 * – p<0,05 при сравнении с интактным контролем, # – p<0,05 при сравнении с группой АКАТОЛ + Облучение.						
2 ЛП – лечебный режим применения через 24 часа после облучения, ЛПП – лечебно-профилактический режим применения начиная за 7 суток до облучения.						

Определение эффективной дозы композиции ВР-С3

После введения циклофосфамидом (ЦФ, 300 мг/кг) на 4 сутки происходило снижение содержания лейкоцитов в крови экспериментальных животных на 78% от исходного уровня в группе. В группах, получавших вместе с ЦФ ВР-С3, содержание лейкоцитов уменьшалось на 72%, 67% и 54% для доз ВР-С3 15, 75 и 150 мг/кг, соответственно. На 7 сутки в группе ЦФ содержание лейкоцитов составило 45% от исходного уровня, в опытных группах – 50%, 21% и 5%, соответственно. К 11 дню опыта показатели «белой» крови достигли уровня контрольной группы. При изучении клеточности костного мозга на 4 день опыта наблюдалось резкое ее снижение у всех животных, получавших ЦФ. При применении ВР-С3 количество выживших клеток костного мозга было выше, чем у животных, получавших только ЦФ, на 9%, 49% и 86% для низкой, средней и высокой дозы, соответственно. К 11 дню опыта происходило восстановление клеточности костного мозга, а при применении ВР-С3 в дозе 150 мг/кг показатели статистически достоверно превышали таковые для контроля. Далее углубленно исследовали дозу ВР-С3 75 мг/кг, как оказывающую достаточный эффект на кроветворение и не приводящую к избыточной стимуляции клеток костного мозга.

Оценивали эффективность ВР-С3 при введении циклофосфамида, а также 5-фторурацила. Применение ВР-С3 значимо увеличивало клеточность костного мозга на 11 сутки наблюдения при использовании композиции в комбинации с 5-фторурацилом (Таблица 7).

Таблица 7 – Количество миелокариоцитов костного мозга ($\times 10^6$ /бедро) мышей разных групп, получавших 5-фторурацил или циклофосфамид

Группа	День опыта	
	4	11
Контроль интактный	21,4 \pm 2,2	23,1 \pm 2,1
5-ФУ (150 мг/кг)	1,2 \pm 0,2 ***	14,2 \pm 1,1 **
5-ФУ (150 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	1,4 \pm 0,4 ***	17,5 \pm 1,1 #
ЦФ (300 мг/кг)	2,1 \pm 0,7 ***	19,8 \pm 1,5
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	3,1 \pm 0,5 ***	21,2 \pm 2,0
ЦФ (300 мг/кг) + Филграстим (20мг/кг)	7,1 \pm 2,0 ***	–
ВР-С3 (75 мг/кг)	22,5 \pm 1,9	22,9 \pm 2,2

Примечание – * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой, # – $p < 0,05$, по сравнению с группой 5-ФУ (критерий Стьюдента, данные приведены в виде $M \pm СКО$).

Композиция ВР-С3 в комбинации с циклофосфамидом и 5-фторурацилом способствовала сохранению исходной массы селезенки у мышей на 4 день опыта и вызывала ее увеличение по сравнению с контролем на 11 день опыта (Таблица 8).

Таблица 8 – Масса селезенки (мг) мышей разных групп, получавших 5-фторурацил или циклофосфамид

Группа	День опыта	
	4	11
Контроль интактный	115,9 \pm 9,3	121,4 \pm 9,4
5-ФУ (150 мг/кг)	46,4 \pm 4,1 ***	147,8 \pm 22,5
5-ФУ (150 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	74,4 \pm 8,8 ** #	168,0 \pm 33,7
ЦФ (300 мг/кг)	29,7 \pm 0,3 ***	32,9 \pm 1,2 ***
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	49,0 \pm 6,6 *** &	174,0 \pm 20,0 &
ЦФ (300 мг/кг) + Филграстим (20мг/кг)	42,0 \pm 6,9 ***	–
ВР-С3 (75 мг/кг)	113,0 \pm 13,9	100,6 \pm 2,2

Примечание – ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой (критерий Стьюдента), # – $p < 0,05$ по сравнению с группой 5-ФУ, & – $p < 0,05$ по сравнению с группой ЦФ, данные приведены в виде $M \pm СКО$.

Влияние режима введения композиции ВР-С3 по лечебной и лечебно-профилактической схеме на модели 5-ФУ индуцированной миелосупрессии

В группе мышей SHR, получавших только 5-фторурацил, наблюдалась смертность 29%, в группе с введением 5-ФУ и ВР-С3

по лечебно-профилактической схеме смертность мышей также составила 29%, но происходила на 1–11 дней позже. Смертность в группе мышей, получавших 5-ФУ и терапевтическую схему применения ВР-С3 была снижена до 5%. Для оценки органоспецифического токсического действия 5-ФУ определяли и анализировали соотношения вес органа / тело, значения коэффициентов для сердца, печени и почек не отличались от контроля, поэтому не приведены (Таблица 9).

Таблица 9 – Весовые коэффициенты орган/тело у мышей разных групп при введении 5-ФУ

Группа	Соотношение веса селезенка/тело (мг/10 г) на экспериментальный день		
	4	11	20
1 Контроль	36,4±3,0	38,4±2,8	37,1±5,4
2 5-ФУ	16,6±1,6 ^a	45,1±6,7 ^b	89,0±5,0 ^{a,c}
3 ВР-С3 + 5-ФУ + ВР-С3	23,9±2,7	55,0±10,3 ^{b,c}	95,0±2,8 ^{a,c}
4 5-ФУ + ВР-С3	36,3±2,0	92,9±9,8 ^{a,c}	80,8±5,2 ^{a,c}
5 ВР-С3	35,9±5,1	30,8±0,7	35,4±1,8
Группа	Соотношение веса тимус/тело (мг/10 г) на экспериментальный день		
	4	11	20
1 Контроль	22,3±2,8	22,2±1,5	20,6±0,7
2 5-ФУ	14,0±1,1 ^a	18,4±2,4	20,4±1,6
3 ВР-С3 + 5-ФУ + ВР-С3	18,9±3,8	21,0±1,5	21,2±2,3
4 5-ФУ + ВР-С3	16,2±1,1	15,9±1,2	17,2±1,2
5 ВР-С3	19,5±2,6	22,6±1,5	21,0±1,0
Примечание – ^a – P<0,05 по сравнению с контрольной группой в тот же день; ^b – P<0,05 по сравнению с группой 5-ФУ + ВР-С3 в тот же день; ^c – P<0,05 по сравнению с группой ВР-С3 в тот же день (данные обработаны с применением метода двухстороннего анализа ANOVA).			

Использование ВР-С3 не влияло на степень подавления 5-ФУ гемопоэза в костном мозге, которое наблюдалось на 4-й день. Однако во время фазы восстановления гемопоэза наблюдались различия в эффектах при применении ВР-С3 в терапевтическом и лечебно-терапевтическом режимах. На 11-й день значительно меньше миелокариоцитов наблюдалось в группе 5-ФУ + ВР-С3 по сравнению с группой 5-ФУ (P<0,05) и группой ВР-С3 + 5-ФУ + ВР-С3 (P<0,01). Однако на 20-й день количество миелокариоцитов в группе 5-ФУ + ВР-С3 было значительно выше по сравнению с группой 5-ФУ

($P < 0,05$) и группой ВР-С3 + 5-ФУ + ВР-С3 ($P < 0,01$). Таким образом, режим введения ВР-С3 оказывает различное влияние на гематологические параметры кроветворных органов и периферической крови.

Гистологическое исследование тощей кишки на 4-й день после введения 5-ФУ выявило гибель крипт, укорочение или потерю ворсин и хронический воспалительный ответ в слизистой оболочке кишечника (Рисунок 5 А, Б, В).

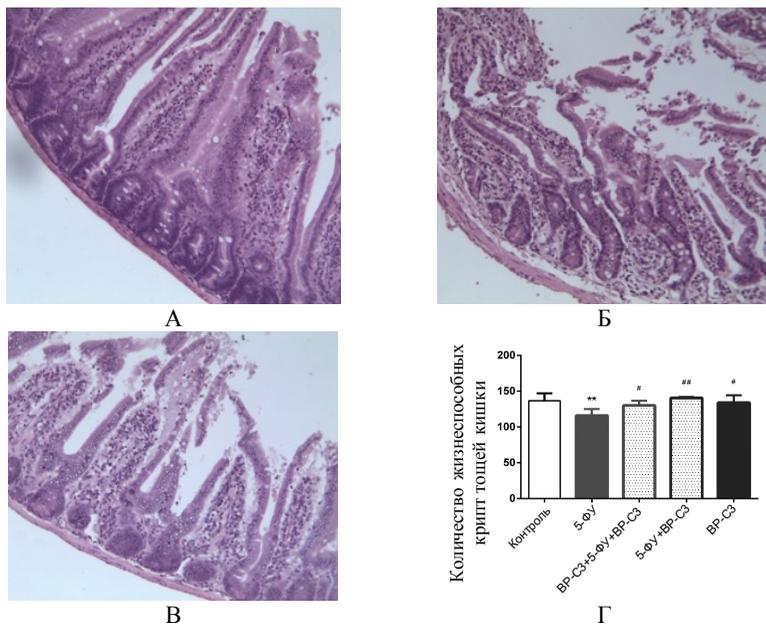


Рисунок 5 – Микрофотографии гистологических препаратов тощей кишки мыши (гематоксилин-эозин, $\times 400$), А – контроль, Б – 5-ФУ, В – 5-ФУ+ВР-С3. Г – количество жизнеспособных крипт тощей кишки в опытных группах на 4-й день после введения 5-ФУ. ** – $P < 0,01$ по сравнению с контролем; # – $P < 0,05$ и ## – $P < 0,01$ по сравнению с группой 5-ФУ

Количество жизнеспособных крипт на поперечный срез кишечника значительно уменьшилось в группе 5-ФУ ($P < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, Рисунок 5 Г). Сочетание с 5-ФУ ВР-С3 способствовало сохранению жизнеспособности кишечных крипт при введении по лечебно-профилактической ($P < 0,05$), либо по

терапевтической ($P < 0,01$) схеме. Введение только ВР-СЗ не влияло на количество жизнеспособных кишечных крипт. Таким образом, ВР-СЗ оказывает выраженное защитное действие в отношении эпителия тонкой кишки от повреждений, вызванных 5-ФУ.

Композиция ВР-СЗ оказывала корректирующее влияние на нарушения антиоксидантной системы мышей, вызванные 5-ФУ (5 введений в дозе 50 мг/кг) (Таблица 10).

Таблица 10 – Супероксиддисмутазная, общая пероксидазразрушающая активность лизата эритроцитов и содержание малонового диальдегида в лизате эритроцитов мышей разных групп, получавших 5-фторурацил 8 сутки после его введения

Параметр	Контроль	Контроль внутрижелудоч- ного введения	5-ФУ	5-ФУ + ВР-СЗ
СОД-активность (U/10 ¹² эритроцитов)	43,7±5,6	39,6±4,5	39,6±3,2	42,7±1,2
Пероксидазразрушаю- щая активность (U/10 ¹² эритроцитов)	25,4±1,8	24,6±2,1	14,1±3,3 *	31,6±5,8
Содержание МДА (нг/10 ¹² эритроцитов)	30,8±2,4	31,1±2,5	45,5±5,3 *	28,1±5,8
Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с остальными группами.				

Влияние ВР-СЗ на эффективность химиотерапевтического лечения на модели сарком мягких тканей у мышей SHR и аденокарцином молочной железы у мышей FVB, трансгенных по HER-2/neu

Средний объем сарком мягких тканей у мышей-самцов из контрольной группы постепенно увеличивался (Рисунок 6А). Введение циклофосфида привело к торможению роста опухоли на 69-85%, что было статистически значимым на 7-21 сутки опыта. Торможение роста опухоли на 44-45% был зафиксировано между 17 и 21 сутками в группе, получавшей только ВР-СЗ. Комбинированное введение циклофосфида и ВР-СЗ привело к торможению роста опухоли на 64-84%. Таким образом, добавление ВР-СЗ к циклофосфамиду не обеспечивало аддитивного или синергетического эффекта у мышей-самцов. Циклофосфамид, при введении мышам-самкам (Рисунок 6Б), приводил к торможению

роста опухоли на 58-74%, и эффект был статистически значимым на 12-21 сутках. ВР-С3 не оказывал существенного влияния на скорость роста опухоли. Торможение роста опухоли на 35-68% с 12-21 сутки опыта наблюдалось у животных, получавших комбинацию ВР-С3 и циклофосфамида. Эффективность комбинации циклофосфамида с ВР-С3 и циклофосфамида была схожей.

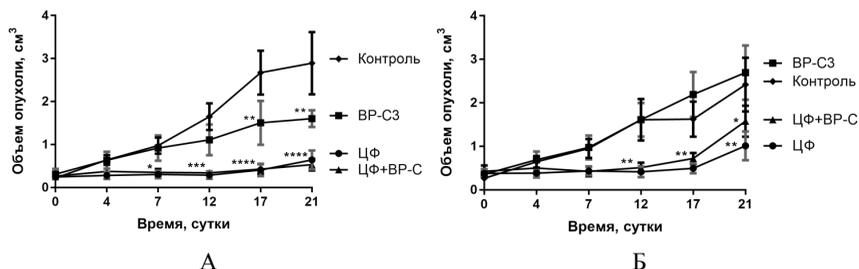


Рисунок 6 – Средний объем опухоли у мышей-самцов (А) и мышей-самок (Б) с саркомами мягких тканей разных групп, получавших циклофосфамид. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$ по сравнению с группой Контроль

У мышей самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu со сформировавшимися аденокарциномами молочной железы было изучено влияние композиции ВР-С3 на эффективность лечения схемой САФ (циклофосфамид + доксорубин + 5-фторурацил), гемцитабином и комбинацией гемцитабин + цисплатин (Рисунок 7А, Б, В). Частота стабилизации заболевания, оцененная по критерию, аналогичному RECIST (Рисунок 7Г), составила в контрольной группе 12,5%, при терапии гемцитабином – 10% ($p=1,0$), при сочетании гемцитабина с цисплатином – 33,3% ($p=0,16$), а при лечении по схеме САФ – 63,6% ($p=0,0006$). При сочетании ВР-С3 с гемцитабином частота стабилизаций увеличилась на 20%, составив 30% ($p=0,26$ по сравнению с контролем). При сочетании ВР-С3 с комбинацией гемцитабина с цисплатином частота стабилизаций не изменилась, составила 33,3% ($p=0,48$ по сравнению с контролем). При сочетании ВР-С3 со схемой САФ частота стабилизаций составила 64,3% ($p=0,0026$ по сравнению с контролем). При введении только ВР-С3 частота стабилизаций была на уровне 19% ($p=0,69$).

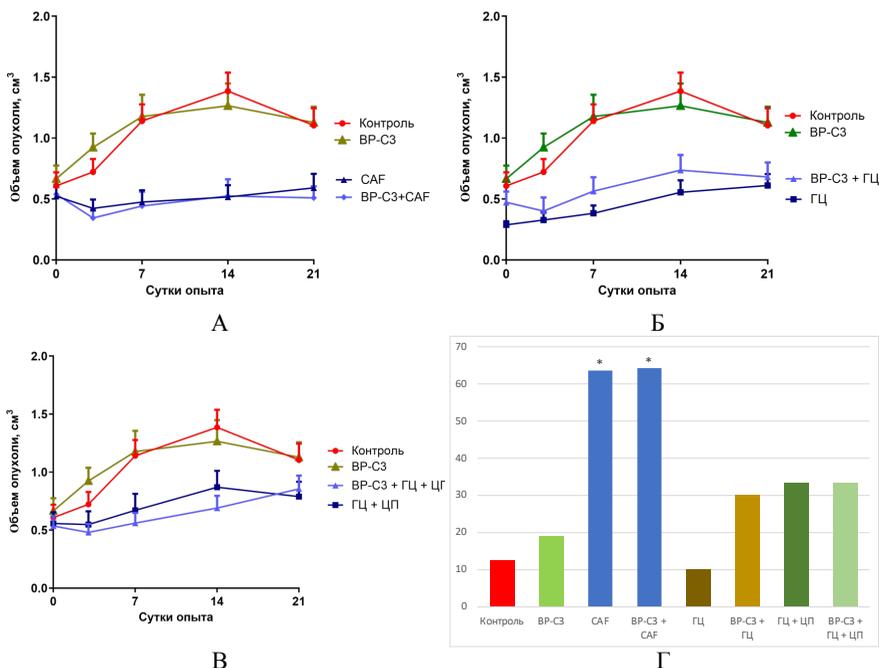


Рисунок 7 – Средний объем опухоли у мышей-самок линии FVB, трансгенных по гену HER-2/neu, при химиотерапии схемой CAF (А), гемцитабином (ГЦ, Б), комбинацией гемцитабина с цисплатином (ГЦ+ЦП, В) в сочетании с VP-C3; частота стабилизаций аденокарцином молочных желез (%) в группах (Г).
 * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$ по сравнению с группой Контроль

Оценка безопасности длительного применения VP-C3

Необходимость исследования была обусловлена тем, что применение VP-C3 планируется для оказания помощи пациентам, получающим курсы химиотерапии, а значит с высокой вероятностью VP-C3 может применяться длительно. Поэтому был изучен эффект длительного применения этого соединения на продолжительность жизни и спонтанный канцерогенез у лабораторных мышей-самок линии SHR. Исследование проведено по протоколу, который был разработан в научной лаборатории канцерогенеза и старения ФГБУ

«НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Анисимов и соавт., 2012; Anisimov et al., 2012).

Начиная с 13,5 месяцев у контрольных мышей наблюдались возрастные нарушения эстральной функции (Рисунок 8А, Б), увеличивалась частота мышей с нерегулярными циклами. Длительность эстрального цикла была увеличена у контрольных мышей после возраста 13,5 месяцев, а в возрасте 19,5 месяцев была на 1,3 дня дольше, чем у мышей, получавших ВР-С3 ($7,7 \pm 0,5$ дня против $6,4 \pm 0,4$ дня, соответственно, $p < 0,05$). Такие изменения не наблюдались в группе ВР-С3 до возраста 19,5 месяцев. Частота мышей с регулярными циклами в подопытной группе по сравнению с контрольной была больше в 5 раз в 13,5 месяцев ($p < 0,05$) и в 3 раза – в 16,5 месяцев ($p < 0,05$).

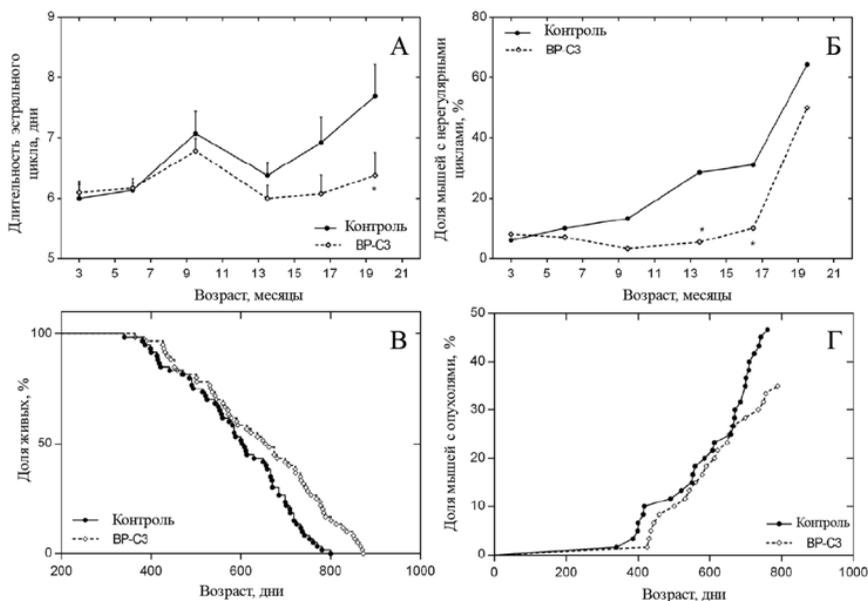


Рисунок 8 – Длительность эстрального цикла (А), доля мышей с нерегулярными эстральными циклами (Б), выживаемость (В) и развитие опухолей (Г) у мышей линии SHR не получавших и получавших ВР-С3 в разном возрасте. * – различия с контролем соответствующего возраста статистически значимы, $p < 0,05$

В начальные сроки опыта выживаемость в подопытной и

контрольной группах была примерно равной (Рисунок 8В). Однако после 600 дня жизни в контрольной группе выживаемость значительно снижалась, тогда как количество подопытных мышей уменьшалось медленнее. В соответствии с логранговым критерием в тесте Мантела-Кокса, наблюдались статистически значимые различия в выживаемости животных контрольной и получавшей ВР-С3 групп ($p=0,0015$), причем наиболее существенным был вклад последнего квартиля (25% последних выживших животных, $p<0,0001$). Различий в выживаемости первого квартиля не наблюдалось (25% первых павших животных, $p=0,088$). Максимальная продолжительность жизни под влиянием композиции увеличивалась на 73 дня (на 9,1%); средняя продолжительность жизни – на 50 дней (8,4%, $p<0,05$); средняя продолжительность жизни последних 10% выживших мышей – на 95 дней (12,4%, $p<0,01$).

При вскрытии выявлено, что причинами гибели животных в обеих группах были опухолевые (48% в контрольной группе и 36% в подопытной) и неопухолевые заболевания (пневмония, гепатит, нефропатия, гнойный аднексит, энтерит и другие), которые у части животных сочетались. Средняя продолжительность жизни мышей без опухолей была выше в группе, получавшей ВР-С3 ($676,0\pm 24,3$ суток), по сравнению с контролем ($606,0\pm 21,7$, $p<0,05$). Частота развития различной неопухолевой патологии статистически значимо не отличалась между опытной и контрольной группами. Возраст до обнаружения первой опухоли в контрольной группе составил 291 день, в опытной – 338 дней (на 1,2 месяца позже). Количество мышей с опухолями в контрольной группе на 12% превышало таковое в группе, получавшей ВР-С3 ($p=0,198$). Общее количество опухолей у животных группы, получавшей ВР-С3, было меньше, чем в контроле (21 и 34 случая, соответственно). В опытной группе отсутствовали случаи множественного рака, частота его встречаемости в контрольной группе составила 8% ($p=0,057$).

Заключение

Результаты наших исследований убедительно свидетельствуют о наличии защитного эффекта ВР-С3 в отношении различных быстро обновляемых тканей организма при проведении цитостатической терапии, что расширяет современные знания о биологической активности этой группы полифенольных производных соединений

лигнина и открывает перспективы для изучения потенциальной возможности клинического применения нового класса соединений. Полученные данные позволяют заключить, что композиция ВР-С2 оказывает противолучевое действие при остром радиационном поражении в диапазоне среднелетальных доз (4–6 Гр). Механизм противолучевого действия ВР-С2, вероятно, связан со значительной перестройкой кроветворения, защитным эффектом в отношении кишечного эпителия, что указывает на перспективность применения этой композиции у онкологических пациентов. Показана высокая безопасность введения композиций на основе гидролизного лигнина животным. Композиция ВР-С3 обладает геропротекторным и антиканцерогенным эффектом. Показания и терапевтический потенциал полифенольных композиций на основе гидролизного лигнина являются предметом будущих экспериментальных и клинических исследований.

Выводы

1. В результате проведенного исследования охарактеризован новый класс препаратов на основе продуктов гидролизного лигнина. Обоснована возможность их применения в качестве сопроводительных средств при химио- и лучевой терапии злокачественных новообразований.

2. На панели Diversity Profile P9 выявлено, что ВР-Сх-1 существенно (ингибирование >50%) взаимодействует с 24 мишенями. Поиск по молекулярным формулам *in silico* в базе ChEMBL и сопоставление с активностью *in vitro* на панели мишеней позволили выявить основные активные компоненты (ряд полифенольных соединений: флавоноиды, сапогенины, фенантрены и др.). Оба метода идентифицировали в качестве мишеней аденозиновые рецепторы A1 и A2, дофаминовый рецептор DRD4, глюкокортикоидный рецептор GR, серотониновый рецептор 5-HT1, рецепторы простагландина EP2 и I2, мускариновый холинергический рецептор CHRM1 и рецептор GABRA1.

3. Установлено, что при системном (внутривенном) введении полифенольного лиганда ВР-Сх-1 в дозе 100 мг/кг мышам, органами преимущественного накопления являются легкие, печень, почки и селезенка, при пероральном введении концентрации в органах животных на несколько порядков меньше. При пероральном

введении полифенольный лиганд характеризуется низкой абсолютной биодоступностью (~1,5%).

4. Композиция ВР-С3 при введении животным оказывает защитное действие в отношении повреждения различных тканей, развивающегося при воздействии химиопрепаратов разных групп. Ее биологическая активность опосредована стимулирующей экстрамедуллярного гемопоэза, защитой органов лимфопоэза и кишечного эпителия, антиоксидантным и противовоспалительным действием. Оптимальная доза композиции составляет 80 мг/кг веса тела перорально для мышей.

5. ВР-С3 не снижает эффективность противоопухолевого лечения сарком мягких тканей циклофосфамидом и аденокарцином молочной железы схемой САФ (циклофосфамид + доксорубин + 5-фторурацил), гемцитабином, комбинацией гемцитабина с цисплатином. При сочетании ВР-С3 с гемцитабином частота стабилизаций увеличилась на 20%, составив 30% ($p=0,2607$ по сравнению с контролем). При сочетании ВР-С3 с комбинацией гемцитабина с цисплатином частота стабилизаций не изменилась (33,3%, $p=0,4832$ по сравнению с контролем), как и при сочетании ВР-С3 со схемой САФ (64,3%, $p=0,0026$ по сравнению с контролем). У самцов мышей с саркомами мягких тканей, индуцированных бензо(а)пиреном, ВР-С3 оказывает собственное противоопухолевое действие (торможение роста опухоли 45%, $p<0,05$).

6. Многократное внутрижелудочное введение ВР-С2 оказывает противолучевое действие при общем γ -облучении в среднелетальном диапазоне доз. Оптимальная радиозащитная доза для крыс составляет 93,7 мг/кг, величина ФИД – 1,2. Оптимальная радиозащитная доза для мышей составляет 81 мг/кг, величина ФИД – 1,1. Механизм действия ВР-С2 включает стимуляцию гемопоэза, защиту кишечного эпителия и стволовых LGR5+ клеток крипт, а также противовоспалительный эффект. Композиция ВР-С2 относится к классу малоопасных веществ, применение композиции ВР-С2 в течение 6 недель в кумулятивной дозе 4200 мг/кг не сопровождается клиническими проявлениями, изменениями гемограммы или биохимических показателей крови крыс.

7. Выявлено, что при гамма-облучении крыс с лимфосаркомой Плисса торможение роста опухоли достигало 59 % ($p<0,05$ по сравнению с контролем), а у животных, получавших ВР-С2, – 40 % ($p<0,05$ по сравнению с контролем), средняя продолжительность

жизни облученных животных с опухолью не отличалась. При введении ВР-С2, выявлен защитный эффект в отношении снижения массы тела облученных крыс с опухолью и развития постлучевой лейкопении (в 1,8 раза) в ранние сроки после облучения животных. На модели аденокарциномы толстого кишечника мышей АКАТОЛ при облучении опухоли протонами высокой энергии показано, что ВР-С2 приводит к меньшему увеличению продолжительности жизни облученных мышей (УПЖ облученных мышей с опухолью 30,7 % ($p < 0,05$), при введении ВР-С2 не более 9,8 %). При применении ВР-С2 происходит нормализация уровня провоспалительного цитокина IL-1 β ($210,7 \pm 19,5$ нг/мл у облученных мышей с опухолью, при введении ВР-С2 $127,9 \pm 21,4$ нг/мл, $p < 0,05$ на 20 сутки после облучения).

8. При оценке канцерогенной безопасности установлено, что длительное введение ВР-С3 самкам мышей SHR угнетает спонтанный канцерогенез и обладает геропротекторным действием, проявляющимся в увеличении продолжительности жизни, замедлении возрастного выключения эстрального цикла. Общее количество опухолей у животных группы, получавшей ВР-С3, составило 21 случай против 34 в контроле. Максимальная продолжительность жизни мышей под влиянием композиции увеличивалась на 73 дня (на 9,1%); средняя продолжительность жизни – на 50 дней (8,4%, $p < 0,05$); средняя продолжительность жизни последних 10% выживших мышей – на 95 дней (12,4%, $p < 0,01$).

Практические рекомендации

1. Композиция ВР-С3 может быть рекомендована для внедрения в клиническую практику после завершения необходимого комплекса исследований общетоксического действия, проведения клинических исследований, в качестве перспективного средства сопроводительного лечения онкологических пациентов для уменьшения токсического действия химиотерапии, проявляющегося в повреждении органов гемопоэза, кишечного эпителия.

2. Композиция ВР-С3 обладает геропротекторным и антиканцерогенным действием, что обуславливает ее потенциал для использования в качестве средства химиопрофилактики первичных и вторичных новообразований у человека.

3. Композиция ВР-С2 обладает радиопротекторной эффективностью в среднететальном диапазоне доз, что, наряду с ее высокой безопасностью, позволяет рекомендовать ее в качестве потенциального средства для профилактики негативных эффектов хронического радиационного воздействия в группах риска.

Перспективы разработки данной темы

Полученные данные расширяют фундаментальные представления об изученном классе соединений, позволяют вести поиск и отбор уникальных соединений с необходимыми свойствами, создают базу для развития фармакологии. Открывается перспективность новых исследований производных гидролизного лигнина не только в медицине, но также в ветеринарии, сельском хозяйстве, для модификации свойств и эффектов различных токсикантов. Предложенный метод оценки фармакокинетики сложных полифенольных композиций может быть применен для изучения биодоступности, распределения и выведения подобных соединений. Радиопротекторные и противовоспалительные свойства композиции ВР-С2 определяют необходимость дальнейшей оценки доз и режимов ее применения для определения соотношения пользы и риска с точки зрения влияния на частоту развития побочных эффектов и на отдаленные результаты лучевого лечения. Геропротекторный эффект композиции ВР-С3 позволяет рассматривать эту композицию в качестве средства профилактики старения населения. Таким образом, перспективность дальнейших исследований данного класса соединений очевидна.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Анисимов В.Н., Забежинский М.А., Попович И.Г., Плисс Г.Б., Беспалов В.Г., Александров В.А., Стуков А.Н., Аникин И.В., Алимova И.Н., Егормин П.А., Панченко А.В., Пискунова Т.С., Семенченко А.В., Тындык М.Л., Юрова М.Н. Современные подходы к изучению канцерогенной безопасности, противоопухолевой, антиканцерогенной и геропротекторной активности фармакологических препаратов // Вопросы онкологии – 2012. – Т. 58, № 1. – С. 7–18.

2. Anisimov V.N., Zabezhinski M.A., Popovich I.G., Pliss G.B., Bepalov V.G., Alexandrov V.A., Stukov A.N., Anikin I.V., Alimova I.N., Egormin P.A., Panchenko A.V., Piskunova T.S., Semenchenko

A.V., Tyndyk M.L., Yurova M.N. Rodent models for the preclinical evaluation of drugs suitable for pharmacological intervention in aging // *Expert Opinion Drug Discovery* – 2012. – Vol.7 (1). – P. 85-95.

3. Анисимов В.Н., Забежинский М.А., Попович И.Г., Тындык М.Л., Аникин И.В., Егормин П.А., Юрова М.Н., Пискунова Т.С., Панченко А.В., Шипов В.П., Пигарев Е.С., Федорос Е.И. Фармакологическая геропротекторная композиция и способ ее получения: пат. 2522547 Российская Федерация // 2014. ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава России, ООО «Нобель» – № 2012147985/15; заявл. 12.11.2012; опубл. 20.07.2014 Бюл. № 20. - 10 с.

4. Navolotskii D.V., Ivanenko N.B., Solovyev N.D., Fedoros E.I., Panchenko A.V. Pharmacokinetics and tissue distribution of novel platinum containing anticancer agent BP-C1 studied in rabbits using sector field inductively coupled plasma mass spectrometry // *Drug Testing and Analysis* – 2015 – Vol. 7(9) – P. 737-744.

5. Губарева Е.А., Панченко А.В., Майдин М.А., Федорос Е.И., Тындык М.Л. Снижение токсического воздействия химиотерапии на эпителий тонкой кишки мышей с помощью полифенольных препаратов / Материалы XIII Всероссийской конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» памяти А.Ю. Барышникова, Москва, 17-18 марта // *Российский Биотерапевтический журнал* – 2016. – Т.15, №1. – С.28.

6. Bykov V.N., Drachev I.S., Gubareva E.A., Panchenko A.V., Pigarev S.E. BP-C2: novel metal-organic mitigator of hematopoietic acute radiation syndrome in mice // 42nd Meeting of the European Radiation Research Society, Poster session, 4-8th of September. – Amsterdam, Netherlands. – 2016. – P.116.

7. Panchenko AV, Popovich IG, Trashkov AP, Egormin PA, Yurova MN, Tyndyk ML, Gubareva EA, Artyukin IN, Vasiliev AG, Khaitsev NV, Zabezhinski MA, Anisimov VN. Biomarkers of aging, life span and spontaneous carcinogenesis in the wild type and HER-2 transgenic FVB/N female mice // *Biogerontology* – 2016 – Vol. 17(2) – P. 317-324.

8. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Yurova MN, Tyndyk ML, Anikin IV, Egormin PA, Baldueva IA, Fedoros EI, Pigarev SE, Panchenko AV. Polyphenolic drug composition based on benzenepolycarboxylic acids (BP-C3) increases life span and inhibits

spontaneous tumorigenesis in female SHR mice // Aging (Albany NY) – 2016. – Vol. 8(9). – P. 1866-1875.

9. Gubareva E.A., Izotova E.I., Fedoros E.I., Panchenko A.V. In silico targets and pathways prediction for a novel multicomponent polyphenolic lignin-derived composition BP-Cx // 3rd Kazan Summer School on Chemoinformatics (5-7 July 2017, Kazan). – Kazan Federal University. – 2017. – P. 49

10. Solovyev ND, Fedoros EI, Drobyshev EJ, Ivanenko NB, Pigarev SE, Tyndyk ML, Anisimov VN, Vilpan YA, Panchenko AV. Anticancer activity and tissue distribution of platinum (II) complex with lignin-derived polymer of benzene-poly-carboxylic acids // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology – 2017 – Vol. 43 – P. 72-79.

11. Панченко А.В., Федорос Е.И., Пигарев С.Е., Быков В.Н., Драчев И.С., Краев С.Ю. Экспериментальное изучение радиозащитной эффективности комплекса полифенольного полимерного производного лигнина с молибдатом аммония — препарата BP-C2 // Радиационная биология. Радиозэкология – 2017. – Т. 57, №5. – С. 1-7.

12. Anisimov VN, Larsen S, Lofberg S, Baldueva I.A., Malek A.V., Nielsen TK, Fedoros E.I., Perminova I.V., Drobyshev E.Yu., Bykov V.N., Panchenko A.V., Scherbakov A.M., Belyaev A.M. Results and prospects of development of new polyphenolic drugs for cancer patients // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8 (59). – P. 100951-100956.

13. Pigarev SE, Gubareva EA, Bykov VN, Drachev IS, Fedoros EI, Panchenko AV. Potential targets of radiomitigative action of BP-C2, a novel metal-organic compound based on polyphenolic ligand // ConRad 2017 - Global Conference on Radiation Topics - Preparedness, Response, Protection and Research. – Bundeswehr Institute of Radiobiology. – 2017. – P. 71-72.

14. Губарева Е.А., Панченко А.В., Майдин М.А., Федорос Е.И., Тындык М.Л., Драчев И.С., Быков В.Н., Аникина Л.К., Нижник В.И. Радиомитигирующее действие молибден-содержащего полифенольного препарата BP-C2 на эпителий тощей кишки мышей, подвергнутых γ -облучению // Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017» 23-25 июня. – Санкт-Петербург, – 2017. – С. 114-115.

15. Bykov VN, Drachev IS, Kraev SY, Maydin MA, Gubareva EA, Pigarev SE, Anisimov VN, Baldueva IA, Fedoros EI, Panchenko

AV. Radioprotective and radiomitigative effects of BP-C2, a novel lignin-derived polyphenolic composition with ammonium molybdate, in two mouse strains exposed to total body irradiation // *International Journal of Radiation Biology*. – 2018. – Vol. 94(2) – P. 114-123.

16. **Panchenko AV**, Fedoros EI, Pigarev SE, Maydin MA, Gubareva EA, Yurova MN, Kireeva GS, Lanskiikh GP, Tyndyk ML, Anisimov VN. Effect of the polyphenol composition BP-C3 on haematological and intestinal indicators of 5-fluorouracil toxicity in mice // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2018. – Vol. 15(3) – P. 3124-3132.

17. Fedoros EI, Orlov AA, Zhrebker A, Gubareva EA, Maydin MA, Konstantinov AI, Krasnov KA, Karapetian RN, Izotova EI, Pigarev SE, **Panchenko AV**, Tyndyk ML, Osolodkin DI, Nikolaev EN, Perminova IV, Anisimov VN. Novel water-soluble lignin derivative BP-Cx-1: identification of components and screening of potential targets in silico and in vitro // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9(26) – P. 18578-18593.

18. Губарева Е.А., **Панченко А.В.**, Федорос Е.И., Майдин М.А. Влияние полифенольной композиции BP-C3 на динамику повреждений эпителия тонкой кишки мышей, вызванных 5-фторурацилом // *Вопросы онкологии*. – 2018. – Т. 64, №2. – С. 261-265.

19. Golubev A.G., **Panchenko A.V.**, Anisimov V.N. Applying parametric models to survival data: tradeoffs between statistical significance, biological plausibility, and common sense // *BioGerontology*. – 2018. – Vol. 19(5) – P. 341-365.

20. **Panchenko AV**, Fedoros EI, Pigarev SE, Maydin MA, Gubareva EA, Kireeva GS, Tyndyk ML, Kuznetsova AI, Nekhaeva TL, Danilova AB, Baldueva IA, Anisimov VN. The Effect of Polyphenolic Composition BP-C3 on the Efficacy and Hematological Toxicity of Cyclophosphamide in the Chemotherapy of Mice Bearing Soft Tissue Sarcomas Induced by Benzo[a]pyrene // *Integrative Cancer Therapies*. – 2019. – Vol.18 – P. 1-13.

21. **Панченко А.В.**, Тындык М.Л., Федорос Е.И., Майдин М.А., Семенов А.Л., Губарева Е.А., Голубев А.Г., Анисимов В.Н. Сравнительный анализ экспериментальной данных о влиянии различных полифенолов на продолжительность жизни и старение // *Успехи геронтологии*. – 2019 – Т.32, №3 – С. 325-330.