

На правах рукописи

СУСЛОВА

Ирина Рудольфовна

**Изучение механизмов противоопухолевого действия производного 4-аминохромена
(*in vivo* и *in vitro* исследование)**

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Блинова Екатерина Валериевна

Официальные оппоненты:

Абакушина Елена Вячеславовна – доктор медицинских наук, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория клинической иммунологии, старший научный сотрудник

Корокин Михаил Викторович – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра фармакологии и клинической фармакологии, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «24» февраля 2021 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.11 на базе ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: www.sechenov.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор



Дроздов Владимир Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Злокачественные новообразования, определяемые как совокупность заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом и распространением атипичных клеток, представляют собой одну из наиболее сложных проблем как с медицинской, так и с социально-экономической точек зрения. Достаточно сказать, что они занимают второе место в структуре смертности населения в России, странах Европейского Союза и США [ACS, 2016; Заридзе и Максимович, 2017].

Последние годы были ознаменованы существенными достижениями в области хирургической онкологии, лучевой терапии и онкофармакологии [Nicoloni et al., 2016], включая создание нового – иммунобиологического подхода – в терапии опухолевых процессов [Khoо et al., 2016]. При этом, в современной онкологии сохраняются серьезные фундаментальные и прикладные проблемы, позволяющие злокачественным опухолям сохранять свою актуальность и значимость, и требующие нетривиальных решений. Первая связана с тем, что злокачественная опухоль – это гетерогенная структура, состоящая из множества различных клеточных популяций [Feinberg et al., 2016].

Другая проблема – формирование резистентных фенотипов неоплазий, характеризующихся как нечувствительностью к цитотоксическим агентам, так и к проапоптотическим стимулам. Эти обстоятельства должны учитываться при разработке новых противоопухолевых агентов. Современные стратегии эффективной химиотерапии основаны на максимальном контроле опухолевой прогрессии, повышении продолжительности качественной жизни пациентов, снижении частоты и выраженности нежелательных эффектов противоопухолевых интервенций [Paterson et al., 2005]. С этим связан и все возрастающий запрос на разработку новых, оригинальных молекул.

Тридцать лет назад главным подходом к созданию новых антибластомных лекарственных средств были методы комбинаторного химического синтеза, позволявшие за счет оптимизации технологического процесса получить множество веществ [Howitz et al., 2018]. Однако, за последние годы тренд в области изыскания новых молекул сдвинулся в область более глубокого изучения свойств природных веществ. В частности, одна треть из двадцатки лидеров продаж на мировом рынке лекарств имеет природное происхождение [Fischbach et al., 2009; Newman et al., 2017], в то время как лишь одна синтетическая молекула на 10000 вновь синтезированных становится лекарственным препаратом.

Преимущества соединений природного происхождения обусловлены следующим. Во-первых, установлено, что натуральные вещества имеют большее эволюционное сродство к биологическим макромолекулам [Cragg et al., 2019]. Во-вторых, природные соединения с

уникальной структурой могут быть источником молекулярных платформ для разработки менее токсичных / более эффективных (селективных) аналогов. Более того, современные технологии позволяют преодолеть многие трудности, связанные со структурной сложностью природных соединений [Vlinoва et al., 2019]. В этой связи наше внимание привлек весьма широкий спектр позиций внутреннего структурного разнообразия класс кумариновых соединений – аминохроменов, у которых описаны уникальные фармакологические свойства.

Степень разработанности темы исследования

В нашей лаборатории было изучено полусинтетическое соединение кумарина – 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитри-ла N-ацетил-аминоэтанат. На модели гетеротопических сингенных опухолей мышей (опухоль легких и меланома В16) в дозозависимом режиме была установлена противоопухолевая активность соединения. Были вычислены эффективные подавляющие концентрации в культуре клеток опухолевой линии человеческого рака легких А549/АТСС, рассчитаны эффективные терапевтические дозы, позволяющие добиваться редукции и ремиссии опухолевого процесса [Скачилова и др., 2018; Дудина и др., 2019; Зобнина и др., 2019; Самышина и др., 2019].

Наряду со значительной антибластомной активностью коллективом авторов также была установлена высокая безопасность внутрижелудочного применения соединения. В частности, коллеги определили, что производное хромена относится к малотоксичным соединениям, при курсовом введении не обладает аллергизирующим, иммуно-, генотоксическим, мутагенным и канцерогенным действием, не обладает репродуктивной токсичностью, что делает 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтанат безусловно привлекательным в качестве потенциального кандидата в лекарственное средство.

Вместе с этим, детального изучения механизма действия, а также фармакокинетики соединения при внутрижелудочном введении не проводилось, что обуславливает несомненную актуальность настоящего исследования.

Цель работы

Определить ведущие механизмы противоопухолевого действия соединения из группы производных 4-аминохромена АХ-554 на ксенографтной модели немелкоклеточного рака легких и в опытах *in vitro*, а также изучить системную кинетику, биодоступность и тканевую концентрацию соединения в легких при внутрижелудочном введении.

Задачи исследования

1. Разработать биологическую модель с использованием ксенографтной опухоли человека – немелкоклеточного рака легкого – и атимичных гуманизированных иммунодефицитных мышей для изучения фармакологических свойств соединения аминохромена АХ-554.

2. Изучить влияние соединения 4-аминохромена АХ-554 на экспрессию рецепторной тирозинкиназы анапластической лимфомы (ALK) в ткани опухоли на ксенографтной модели человеческой опухоли легкого у гуманизированных мышей BALB/c nu/nu при внутрижелудочном курсовом введении в различных терапевтических дозах.

3. Оценить влияние соединения 4-аминохромена АХ-554 на тканевое содержание тубулина-бета III (TUBB3) в опухолевой ткани на ксенографтной модели человеческой опухоли легкого у гуманизированных мышей BALB/c nu/nu при внутрижелудочном курсовом введении в различных терапевтических дозах, а также изучить влияние вещества на полимеризацию тубулина головного мозга быка в системе *in vitro*.

4. Изучить влияние АХ-554 на тканевую концентрацию мезенхимально-эпителиального трансформационного фактора (с-MET) в ткани опухоли на ксенографтной модели человеческой опухоли легкого у гуманизированных мышей BALB/c nu/nu при введении в средней терапевтической дозе.

5. Оценить влияние соединения 4-аминохромена АХ-554 на апоптоз опухолевых клеток немелкоклеточного ксенографтного рака легкого у гуманизированных мышей BALB/c nu/nu при введении в средней терапевтической дозе.

6. Провести исследование системной кинетики АХ-554 при внутривенном введении и биодоступности вещества и его тканевой концентрации в легких – при внутрижелудочном введении лабораторным кроликам.

Научная новизна

На платформе оригинальной ксенографтной модели человеческого немелкоклеточного рака легкого с использованием в качестве акцептора атимических иммунодефицитных облученных мышей-самок BALB/c nu/nu с пересаженными человеческими лимфоцитами установлен механизм противобластомного действия 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата (АХ-554) на основе 4-аминохромена. Адекватность разработанной модели поставленным в работе задачам подтверждена подавлением опухолевого роста и метастазирования ксенографтной опухоли на фоне системного применения исследуемого соединения в эффективных дозах.

При курсовом 7-суточном внутрижелудочном введении в средне-терапевтической дозе исследуемое вещество повышает при сравнении с контрольными животными экспрессию каспазы-3 и снижает экспрессию Bcl-2, что свидетельствует об активации апоптоза опухолевых клеток. Наряду с активацией апоптоза соединение индуцирует альтернативный путь гибели опухолевых клеток путем аутофагии, о чем свидетельствует уменьшение уровня экспрессии тирозинкиназы анапластической лимфомы в опухолевой ткани на фоне курсового введения АХ-554. В совокупности, оба феномена доказывают подавление явлений опухолевой прогрессии.

Исследуемое соединение 4-аминохромена АХ-554 подавляет процесс репликации за счет снижения продукции структурного компонента микротрубочек – бета-тубулина класса 3, участвующего в процессе клеточного деления в гомогенате опухолевой ткани. Кроме того, при инкубации тубулина-мономера головного мозга быка с АХ-554 в концентрации 2×10^{-7} М на 31,2% снижается скорость полимеризации тубулина.

Установлено, что поскольку экспрессия с-MET/HGF в опытных и контрольных группах не обладает значимыми различиями, а также исходя из того, что образцы опухолевой ткани, использованные в формировании ксенографта не подвергались фармакологическому воздействию, 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3] диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтанол не вызывает формирования фармакорезистентности.

При внутрижелудочном введении 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтанол в диапазоне доз от минимально-действующей до высшей терапевтической создает в крови и ткани легких концентрации, превышающие значение IC_{50} , установленные в культуре клеток, сохраняющиеся более 5 часов. Совокупность полученных данных свидетельствует о наличии в механизме действия АХ-554 антипролиферативного, антиметастатического компонент, способности активировать программируемую гибель опухолевых клеток и, в совокупности с ранее полученными данными о хронической токсичности вещества, прогнозировать его относительную безопасность.

Научно-практическая значимость работы

Разработана биологическая *in vivo* платформа для изучения фармакологических свойств перспективных лекарственных средств для лечения немелкоклеточного рака легкого с использованием в качестве акцептора атимических иммунодефицитных облученных мышей-самок BALB/c nu/nu с пересаженными человеческими лимфоцитами.

Получены исчерпывающие данные о влиянии соединения 4-аминохромена АХ-554 на ключевые элементы опухолевой прогрессии (пролиферация, миграция, апоптотические процессы, формирование фармакорезистентности) немелкоклеточного рака легкого, позволяющие рассматривать вещество как перспективного кандидата в лекарственное средство.

Разработана аналитическая методика определения 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтанола в крови и ткани легких лабораторных животных, проведено исследование системной кинетики при внутривенном и внутрижелудочном введении, биодоступности и тканевой концентрации АХ-554 при внутрижелудочном введении кроликам, обоснована целесообразность использования пути введения внутрь при выборе способов и режимов введения лекарственного вещества.

Методология и методы исследования

Выполнение диссертационного исследования потребовало разработки технологии химического синтеза 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата, а также создания биологической модели для исследования механизма действия АХ-554 в условиях воздействия вещества на ткани и клетки немелкоклеточного рака легкого человека. Для реализации поставленной задачи использовали 10-12 недельных атимичных мышей-самок BALB/c nu/nu, подвергнутых сублетальному облучению, с последующими трансплантацией человеческих лимфоцитов и перевивкой фрагментов живой человеческой опухоли.

Влияние АХ-554 на процессы аутофагии оценили по уровню экспрессии и внутриклеточной концентрации рецепторной киназы анапластической лимфомы (PI3K/ALK) с помощью количественного твердофазного иммуноферментного анализа. Антипролиферативное действие вещества изучено как с использованием ксенографтной опухоли (определение уровня тубулина-бета класса 3 в раковых клетках), так и в модельной системе полимеризации тубулина головного мозга быка при его инкубации с АХ-554 в IC₅₀. Состояние программируемой гибели клеток опухоли животных, получавших АХ-554, оценивали методом иммуногистохимического определения экспрессии ключевых сигнальных молекул апоптоза – Bcl-2 и каспазы-3. Антиметастатический эффект оценивали путем подсчета количества метастатических очагов во внутренних органах животных – носителей человеческой опухоли.

Извлечение АХ-554 из плазмы проводили путем жидкостно-жидкостной экстракцией этилацетатом с последующим упариванием органических вытяжек в вакууме досуха и последующей рекстракцией аналита из твердого остатка подвижной фазой. Для количественного определения АХ-554 в виде 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диок-сол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата в пробах крови и гомогенатах легких был разработан метод ВЭЖХ с использованием внутреннего стандарта и масс-селективным детектированием аналита. Ионизация электроспреем (ESI) является наиболее «мягкой» и позволяет одновременно наблюдать как молекулярные ионы, так и продукты их глубоких фрагментаций при помощи настройки блока ионизации и источника ионов.

Связь диссертации с основными научными темами

Диссертация подготовлена при частичной финансовой и методической поддержке Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (проект №14.N08.11.084 «Доклинические исследования лекарственного средства, действующего на рецепторные тирозинкиназы ALK (киназа анапластической лимфомы) и Met,

Бета-тубулин класс 3 (TUBB3), для лечения рака лёгких»), внутреннего гранта ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) в рамках Федеральной программы «5-100».

Важнейшие положения диссертационной работы используются в научной работе кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), внедрены в исследовательский процесс лаборатории фармакологии и отдела химии, технологии и аналитического контроля синтетических лекарственных средств АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» (г. Старая Купавна Московской области).

Основные положения, выносимые на защиту

1. 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноат при курсовом 7-суточном внутрижелудочном введении гуманизированным иммунодефицитным мышам BALB/c nu/nu – носителям ксенографтного немелкоклеточного рака легкого в эффективных терапевтических дозах подавляет рост опухоли, сдерживает метастазирование, приводит к формированию ремиссии у 20% животных.

2. В основе противоопухолевого эффекта соединения АХ-554 лежат несколько механизмов: активация процессов гибели опухолевых клеток – аутофагии, вследствие снижение экспрессии PI3K/ALK, апоптоза за счет подавления экспрессии каспазы-3 и активации Bcl-2; антипролиферативное действие, реализующееся как за счет снижения синтеза тубулина-бета 3 мономера в клетках опухоли, так и вследствие угнетения интенсивности его полимеризации; предотвращение формирования фармакорезистентности, реализующееся по пути блокады экспрессии c-MET в опухолевых клетках.

3. На основе разработанного аналитического метода определена системная и тканевая кинетика соединения при внутривенном и внутрижелудочном введении. АХ-554 вне зависимости от введенной дозы быстро всасывается в системный кровоток, достигая пиковой концентрации в плазме к 2 часам. Абсолютная биодоступность АХ-554, введенного в виде субстанции, в дозах 37,4 мг/кг (пропорциональна средне-терапевтической дозе для кролика) и 104,3 мг/кг (соответствует высшей терапевтической дозе для кролика), составляет более 90%. Вещество создает действующую концентрацию в легких (C_{max}) 9,2 мкг/мл, достаточную для реализации терапевтического действия соединения, сохраняющуюся в течение 6,18 часов после регистрации пика.

Степень достоверности

Достоверность представленных в работе результатов подтверждается использованием в качестве предмета изучения фармацевтической субстанции 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-

метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата, полученной от разработчика с протоколом анализа серии 2с; применением линейных лабораторных животных BALB/c nu/nu, полученных из сертифицированного питомника SPF-животных; выполнением всех манипуляций по забору опухолевого материала пациентов и его последующей трансплантации животных в строгом соответствии с утвержденным на заседании ЛЭК ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) протоколом диссертационного исследования; формированием репрезентативных исследовательских групп; использованием международно-признанных и описанных в ведущих зарубежных периодических изданиях методов исследования, сертифицированных диагностических систем, откалиброванных приборов и аппаратов; применением корректных методов статистической обработки полученных данных.

Апробация диссертационной работы

Апробация диссертационной работы проведена на совместном расширенном заседании кафедр фармацевтической технологии и фармакологии Института фармации; оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол №1 от 24.08.2020 г.

Результаты настоящего диссертационного проекта обсуждались и докладывались на XXVI и XXVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2019, 2020), конференции «Исследования молодых ученых в решении актуальных проблем медицинской науки и практики» (Самара, 2018), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2019), International Congress of Anatomy (London, 2019).

Личный вклад автора

Автор сформулировала идею и гипотезу настоящего диссертационного проекта, разработала его детализированный план. И.Р. Сулова в составе исследовательского коллектива разработала методику получения субстанции вещества АХ-554. Лично автором осуществлены все манипуляции с биологическим материалом пациентов, а также процедуры по формированию гетеротопической ксенографтной экспериментальной модели немелкоклеточного рака легкого. Лично автор регистрировала подлежащие анализу параметры состояния носителей опухоли и самой неоплазии. При непосредственном и включенном участии диссертанта разработана методика определения АХ-554 в ткани и биологических жидкостях, проведены иммуноферментный и иммуногистохимический анализ образцов опухолевой ткани, получавшей фармакологическое воздействие, поставлены опыты по изучению динамики полимеризации тубулина. Автор самостоятельно провела статистический

анализ полученных результатов, деятельно участвовала в подготовке рукописей публикаций и заявки на получение патента на изобретение. Перу автора принадлежит настоящее диссертационное сочинение.

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертационного исследования опубликовано 12 научных работ, из них: 3 статьи – в журналах, входящих в перечень ВАК при Минобрнауки России, 3 статьи – в журналах, индексируемых международными системой цитирования Scopus и Web of Science, и 1 патент на изобретение Российской Федерации.

Объём и структура работы

Диссертационное исследование имеет традиционную структуру, состоит из введения, главы 1 (литературного обзора), главы 2 с описанием материалов и методов исследования, трех глав с изложением полученных результатов, заключения, выводов и практических рекомендаций. Работа изложена на 128 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 23 рисунками, 11 таблицами, содержит приложение А. Библиографический список состоит из выходных данных 232 литературных источников, из которых 225 – иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Настоящее диссертационное исследование выполнено в соответствии с требованиями приказа Минздрава России №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», иными нормативными правовыми актами, регламентирующими доклинические лабораторные исследования, основываясь на принципах гуманного обращения с подопытными животными. Протоколы лабораторных экспериментов прошли этическую экспертизу на заседании Локального этического комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (2июля 2020 года, протокол №53). Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Лабораторные животные и соблюдение требований к их содержанию

In vivo фрагмент работы выполнен на 165 самках 10-12 недельных иммунодефицитных атимических мышей BALB/c nu/nu, полученных в питомнике SPF-животных ФГБУ «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН» (г. Пущино), 9 кроликов породы «Советская шиншилла» весом 2500-3000 г, полученных в виварии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

У всех животных осуществляли контроль болевого синдрома с использованием мимической шкалы оценки боли. Мышам с умеренным болевым синдромом вводили внутри-

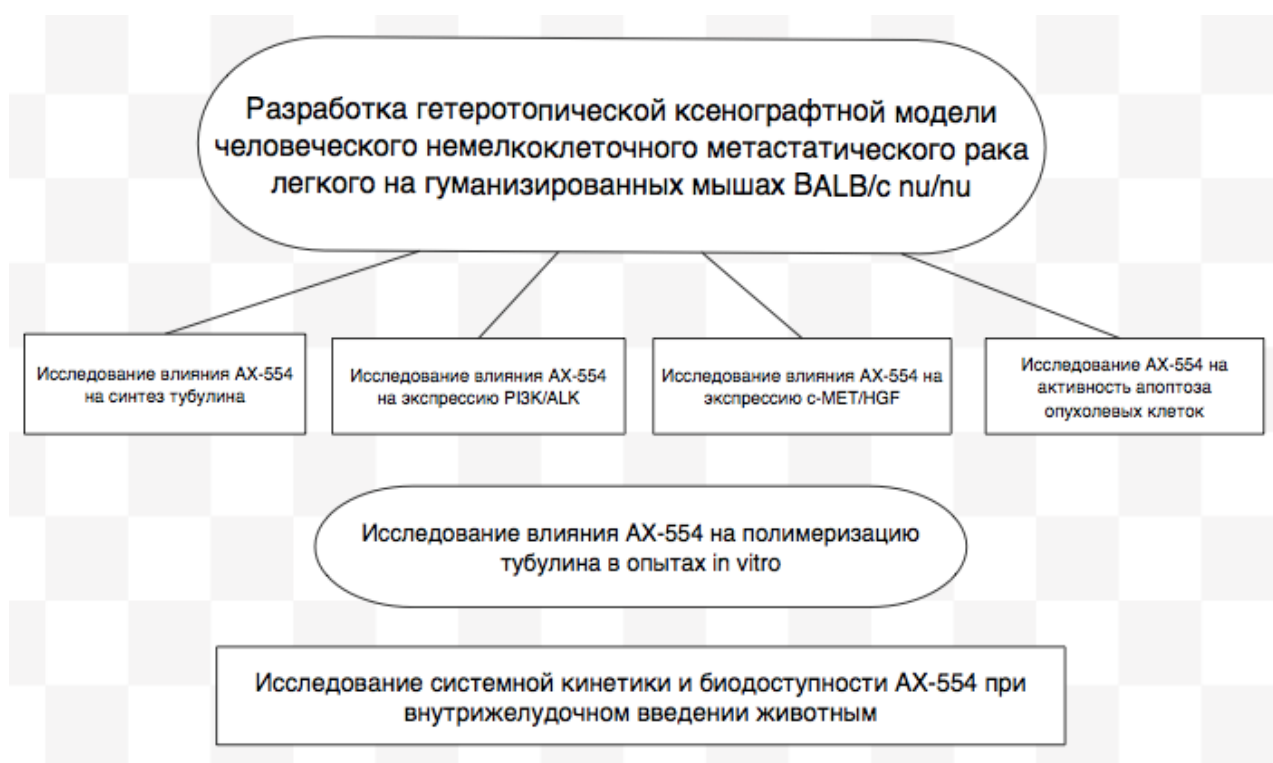


Рисунок 1. Дизайн исследования

желудочно кетопрофен (K1751, Merch-SIGMA-Aldrich, Германия) в дозе 100 мг/кг дважды в сутки. Животных с тяжелым неконтролируемым болевым синдромом выводили из эксперимента под эфирным обезболиванием.

Фармакологическая характеристика исследуемого вещества и препаратов сравнения, обоснование доз, путей и режимов введения

Предметом исследования явилось соединение хромена¹ – 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаной (лабораторный шифр AX-554, рисунок 2), синтезированное в АО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна, Россия). При изучении механизма действия AX-554 в опытах на животных –носителях ксенографтной модели рака легкого вещество вводили мышам внутрижелудочно с помощью полиэтиленового катетера и электронного программируемого двухканального инжектора производства «Kent Scientific» (США) в высшей (ВТД), средне-терапевтической (СТД) и минимально-действующей дозах (МДД), определенных нами совместно с к.м.н. М.О. Дудиной: МДД – 21,2 мг/кг, СТД – 137,6 мг/кг и ВТД – 384,0 мг/кг. В желудок AX-554 вводили в 1% крахмальном клейстере в объеме 0,5 мл. При проведении исследований в *in vitro* модельной системе AX-544 применяли в средней подавляющей концентрации (IC₅₀),

¹Выражаем признательность руководству АО «ВНЦ БАВ» и лично проф. С.Я. Скачиловой за предоставленную субстанцию AX-554

составляющей 2×10^{-7} М. Раствор приготавливали *ex tempore* с использованием в качестве растворителя подогретого физиологического раствора 0,9% хлорида натрия.

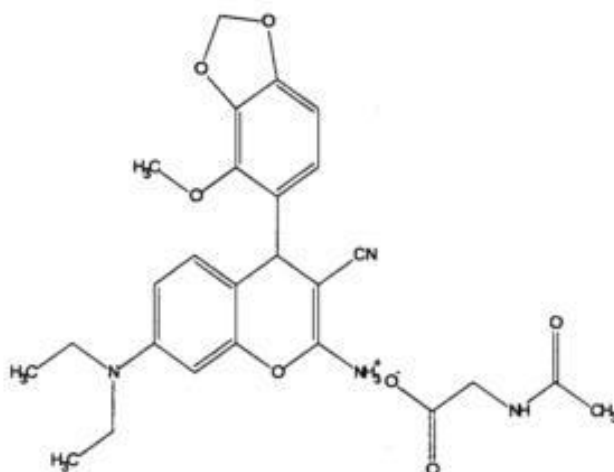


Рисунок 2. Структурная формула соединения AX-554 – 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата

В качестве референтных противоопухолевых препаратов на ксенографтной модели рака легкого использовали доксорубицин (Доксорубицин-Тева, лиофилизат для приготовления раствора для внутрисосудистого введения, 50 мг, серия 17C30LA, срок годности до 03.2022 г., Фармхеми, Нидерланды) и цисплатин (Цисплатин-Лэнс, концентрат для приготовления раствора для инфузий 0,5 мг/мл, серия 240913, срок годности до 01.2021 г., Верофарм, Россия) в эффективных противоопухолевых дозах, пропорциональных дозе AX-554 по данным доклинических исследований. В *in vitro* опытах в качестве положительного контроля применяли колхицин (Colchicine, субстанция, серия 64-86-8, чистота 99,8%, Merch-SIGMA-Aldrich, Германия).

Методы исследования

Для формирования ксенографтной модели немелкоклеточного рака легкого использовали метод, описанный нами ранее [Blinova E. et al., 2019]. Для целей исследования использовали образцы тканей первичных опухолей без клинических и инструментальных признаков метастазирования пациентов, не получавших химиотерапевтического воздействия в анамнезе. Для трансплантации использовали только немелкоклеточные формы рака легкого, экспрессирующие Vcl-2 и неэкспрессирующие или низкоэкспрессирующие каспазу-3. Кусочки опухоли, отобранные для перевивки, делили микрохирургическими ножницами (Precision Instruments, США) на мелкие фрагменты объемом 0,8-5,0 мм³, и с помощью трансплантационной иглы 8-10 кусочков пересаживали подкожно в области наружной поверхности бедра задней конечности мыши. После увеличения размера опухоли в четыре раза по сравнению с исходно-пересаженным объемом опухоль извлекали

и процедуру повторяли трижды. Ксенографт считали сформированным после гистологического и ИГХ подтверждения идентичности опухоли первичному материнскому образцу. Животных – акцепторов ксенографтной опухоли перед финальной инокуляцией опухоли облучали в дозе 3,5 Гр на аппарате Рентген-ТА 150/10 (ОАО «Спектр», Россия), после чего каждой мышце внутрибрюшинно вводили приблизительно 5×10^7 клеток/мышь человеческих лимфоцитов. Лимфоциты получали из пакетов с лейкоцитарной массой и известным количеством лимфоцитов в 1 мл.

Формирование экспериментальных групп животных со сформированным ксенографтом проводили при достижении опухоли размеров 100-200 мм³. Каждая группа включала 15 животных со сформированным ксенографтом. 5 отобранных случайным образом животных выводили из эксперимента на 21 сутки после окончания введения АХ-554 или референтного препарата, опухоли извлекали и проводили лабораторные исследования. За оставшимися животными наблюдали, оценивая динамику роста опухоли и выживаемость в группах. Животным опытных групп вводили соединение АХ-554 внутривенно в объеме 0,5 мл однократно в сутки в течение 7 суток, референтные препараты – в соответствии с клиническими рекомендациями. Размер опухоли измеряли дважды в неделю, начиная с первого дня после окончания введения исследуемого вещества и препаратов сравнения. Вычисляли индекс торможения роста опухоли (ТРО).

Влияние АХ-554 на уровень экспрессии рецепторной формы тирозинкиназы PI3K/ALK, тубулина-бета 3 и c-MET в клетках немелкоклеточного рака легкого изучили в опухолевой ткани ксенографтных узлов на 21 сутки после окончания введения исследуемого соединения или референтных препаратов методом количественного твердофазного ИФА по принципу «сэндвич» с использованием диагностического набора Mouse ALK tyrosinekinase receptor (ALK) ELISA Kit (Abnova, США, каталожный № abx515274), диагностического набора Mouse tubulin beta 3 ELISA Kit (Cusabio, Китай), диагностического набора Mouse Hepatocyte Growth Factor / c-MET ELISA Kit (Cusabio, Китай) и автоматического анализатора Statfax 4200 (США).

Антиапоптотическую активность АХ-554 изучали по уровню экспрессии регуляторов апоптоза – каспазы-3 и Bcl-2 в ткани опухоли легкого, извлеченной у животных, получавших курсовую терапию соединением хромена, методом ИГХ.

Влияние АХ-554 на полимеризацию тубулина изучили при его инкубации в IC₅₀ с использованием *in vitro* модели. Тубулин головного мозга быка (чистота 99%, 2 мг/мл, Cytoskeleton Inc., США) помещался в 100 мкл тубулинового буфера (80 мМ натриевых трубок, рН 6,9, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ хлорида магния, 1 мМ ГТФ и 5% глицерол) при 0°C, затем смесь помещалась в подогретые до 37°C лунки 96-ячеечного планшета, содержащие исследуемое

вещество. Реакция полимеризации запускалась подогреванием смеси до 37°C с ежеминутным мониторингом массы турбидиметрически при длине волны 340 нм на протяжении 45 мин при помощи микропланшетного ридера.

Извлечение АХ-554 из плазмы проводили путем жидкостно-жидкостной экстракции этилацетатом с последующим упариванием органических вытяжек в вакууме досуха и последующей рекстракцией аналита из твердого остатка подвижной фазой. Для количественного определения АХ-554 в пробах крови и легких был разработан метод ВЭЖХ с использованием внутреннего стандарта и масс-селективным детектированием аналита.

Полученные результаты представлены в виде средних величин (средние арифметические или медианы) со среднеквадратическими отклонениями. При сравнении количественных величин использовали одномерную дисперсию (критерий Колмогорова-Смирнова) для проверки гипотезы нормальности распределения, после чего применяли критерии Тьюки или Ньюмена-Кейлса. Анализ выживаемости животных проводили построением соответствующих кривых с их последующим анализом методом Гехана. В расчетной части применяли программные пакеты SPSS (IBM Inc., США) и BioStat, персональный компьютер iMac (Apple, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для обоснования биологической эквивалентности разработанной нами в рамках настоящего диссертационного проекта *in vivo* платформы для исследования фармакологической активности противоопухолевых лекарственных средств помимо механизма действия АХ-554 изучили и терапевтические эффекты соединения в отношении ксенографтного немелкоклеточного рака легкого.

Внутрижелудочное курсовое введение в течение 7 суток АХ-554 животным – носителям опухоли приводило к формированию значимого терапевтического эффекта во всех исследуемых группах (в зависимости от вводимой дозы). Об эффективности АХ-554 даже в минимально-действующей дозе (21,2 мг/кг/сут) говорило то, что через неделю после завершения терапевтического воздействия значение индекса ТРО принимало значение 34%. Эскалация вводимой суточной дозы до 137,6 мг/кг (средняя терапевтическая доза) сопровождалось замедлением роста опухоли (индекс ТРО = 53). Максимальный противоопухолевый эффект (индекс ТРО = 70) достигался в суточной дозе 384,0 мг/кг (высшая терапевтическая доза). В группах животных, получавших АХ-554, на всем протяжении периода наблюдения регистрировали сокращение размеров гетеротопического опухолевого узла. Вещество АХ-554 также увеличивало опухолеспецифическую выживаемость животных (рисунок 3), причем в группе STD АХ-554 показатель выживаемости составил 73 суток, а у животных, получавших ВТД АХ-554 – 78 суток, что в обоих случаях превышает

продолжительность жизни мышей контрольной группы более, чем на 50%. При изучении частоты ремиссий и выздоровлений при использовании АХ-554 в СТД и ВТД, показатель составил 20%.

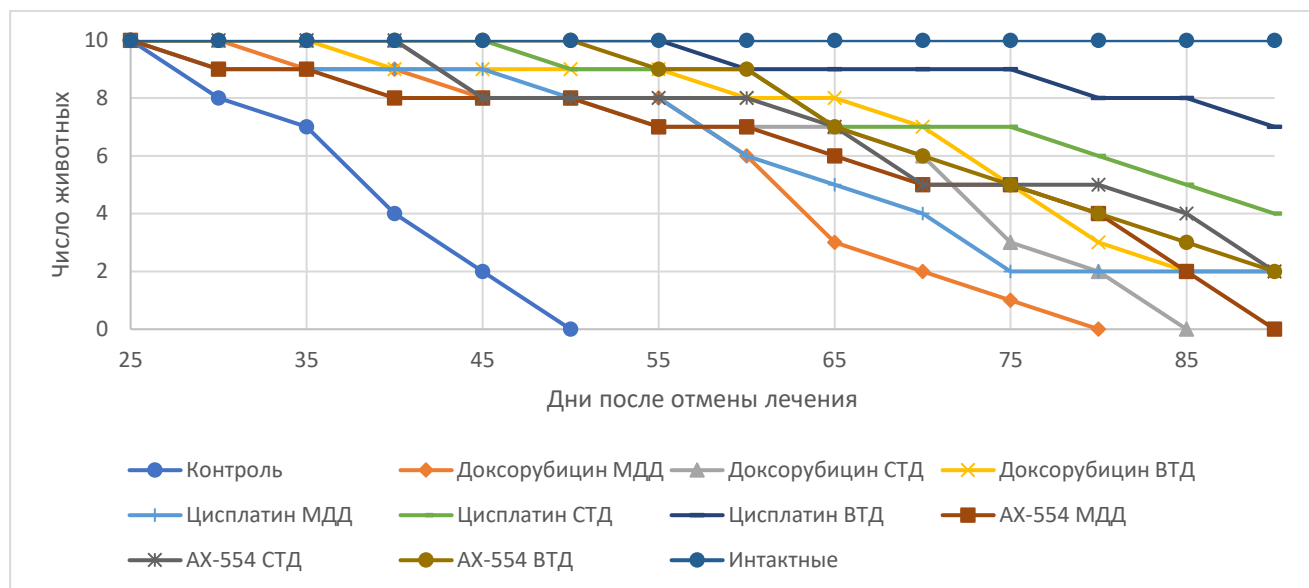
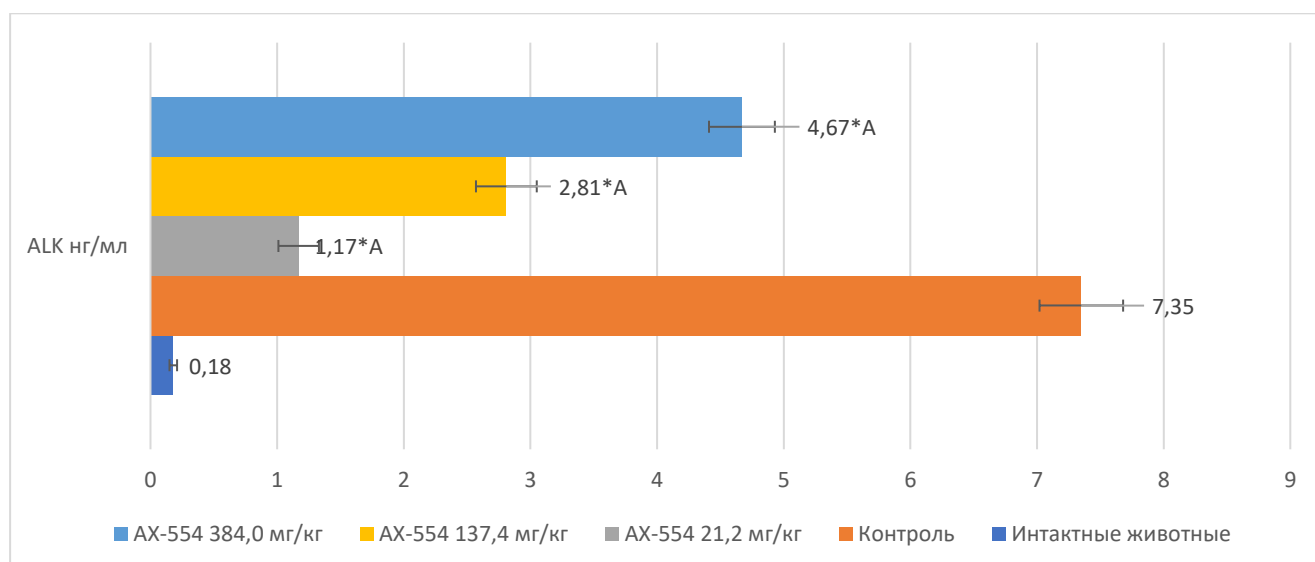


Рисунок 3. Кривая выживаемости животных через 21 день после отмены специфической противоопухолевой терапии

Изучили экспрессию рецепторной тирозинкиназы анапластической лимфомы в ткани ксенографтной карциномы легкого у атимичных гуманизированных мышей-самок (рисунок 4) под действием АХ-554 в трех терапевтических дозах – ВТД, СТД, МДД. Концентрация биомшени в ткани исследована на 21 сутки после трансплантации опухолевых фрагментов.

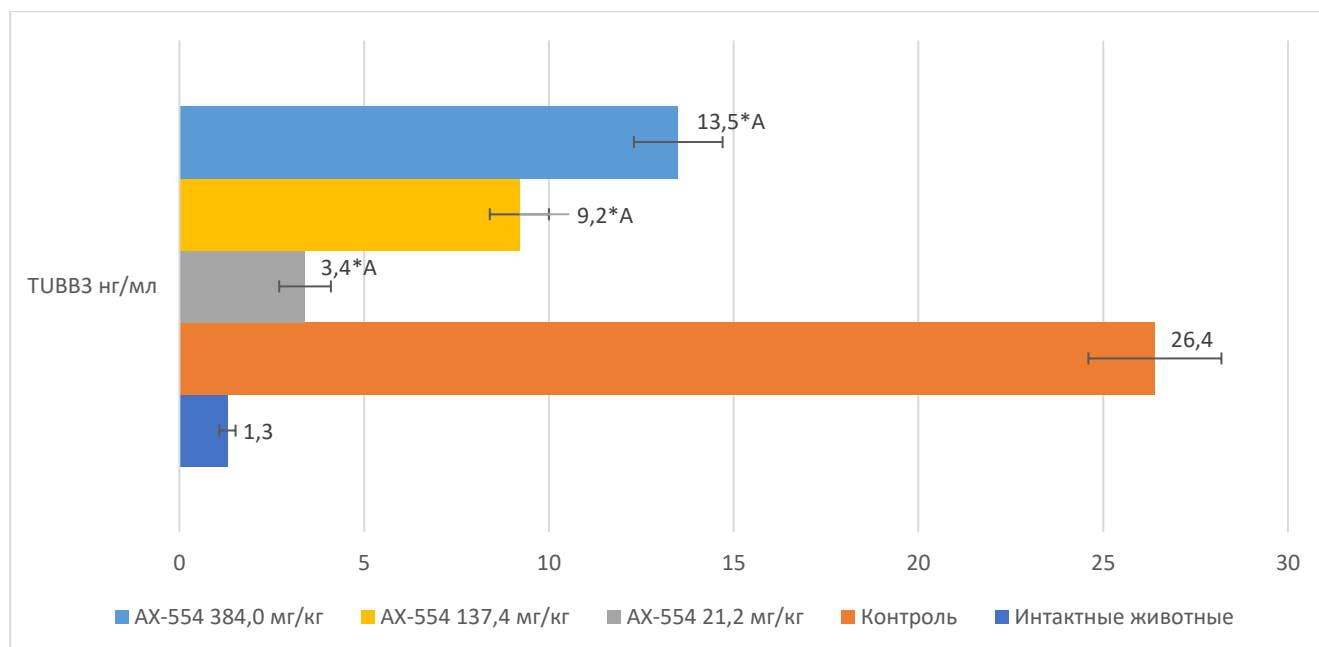


Примечание: * - различия при сравнении с контрольными животными и животными интактной группы статистически значимы при $p < 0,05$; ^A - различия при сравнении с животными, получающими АХ-554 в двух других дозах статистически значимы при $p < 0,05$ (ANOVA, критерий Ньюмена-Кейлса)

Рисунок 4. Уровни ALK в гомогенате опухолевой ткани на фоне 7-суточного введения АХ-554 в терапевтических дозах

У животных контрольной серии уровень фермента повышался при сравнении с интактными животными более, чем в 40 раз. Внутривенное введение вещества АХ-554 оказывало дозозависимый эффект, направленный на снижение уровня биологической мишени в опухолевой ткани: при введении в МДД концентрация АLK в опухоли равнялась в среднем 4,67 нг/мл, при введении в СТД – 2,81, а при введении в ВТД – 1,17 нг/мл, что приближалось к значениям, полученным у интактных животных. Полученные результаты свидетельствуют о том, что АХ-554 приводит к активации аутофагии опухолевых клеток, что может рассматриваться как один из механизмов действия соединения.

Изучили также влияние курсового 7-суточного введения АХ-554 на тканевую концентрацию структурного онкогена – тубулина бета подкласса 3 в ткани немелкоклеточного ксенографтного рака легкого (рисунок 5). У животных контрольной серии уровень структурного онкогена повышался при сравнении с легкими интактных животных более, чем в 20 раз. Введение АХ-554 дозозависимо снижало уровень онкогена в опухолевой ткани: при введении в МДД концентрация тубулина-бета 3 в опухоли равнялась в среднем 13,5 нг/мл, при введении в СТД – 9,2, а при введении в ВТД – 3,4 нг/мл. Полученные результаты говорят о способности 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата подавлять процесс деления опухолевых клеток в силу блокирования образования микротрубочек, необходимых для расхождения ДНК.



Примечание: * - различия при сравнении с контрольными животными и животными интактной группы статистически значимы при $p < 0,05$; ^А - различия при сравнении с животными, получающими АХ-554 в двух других дозах статистически значимы при $p < 0,05$ (ANOVA, критерий Ньюмена-Кейлса)

Рисунок 5. Содержание тубулина бета класса 3 (TUBB3) в гомогенате опухолевой ткани ксенографтного рака легкого на фоне 7-суточного введения АХ-554 в терапевтических дозах

В специально созданной модельной системе изучили влияние различных концентраций АХ-554 на процесс полимеризации тубулина головного мозга быка. АХ-554 исследовали в концентрации 2×10^{-7} М, которая соответствовала IC_{50} , установленной на клеточной культуре человеческой аденокарциномы легкого А547/АТСС [Дудина М.О., 2020]. На рисунке 6 представлены результаты проведенных экспериментов.

При инкубации мономерного тубулина головного мозга быка с АХ-554 в концентрации 2×10^{-7} М наблюдали отставание начала процесса полимеризации в среднем на 4 мин по сравнению с контрольными опытами. Интенсивность полимеризации тубулина на всем протяжении наблюдения была снижена и к концу опыта составила 68,8% от контрольных значений.

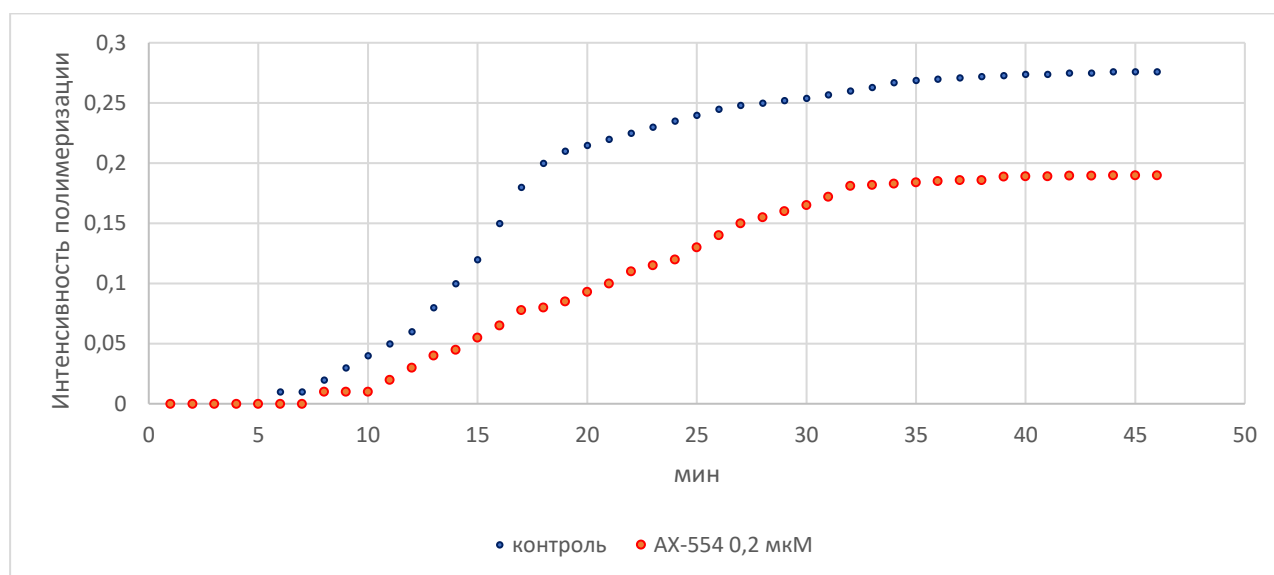
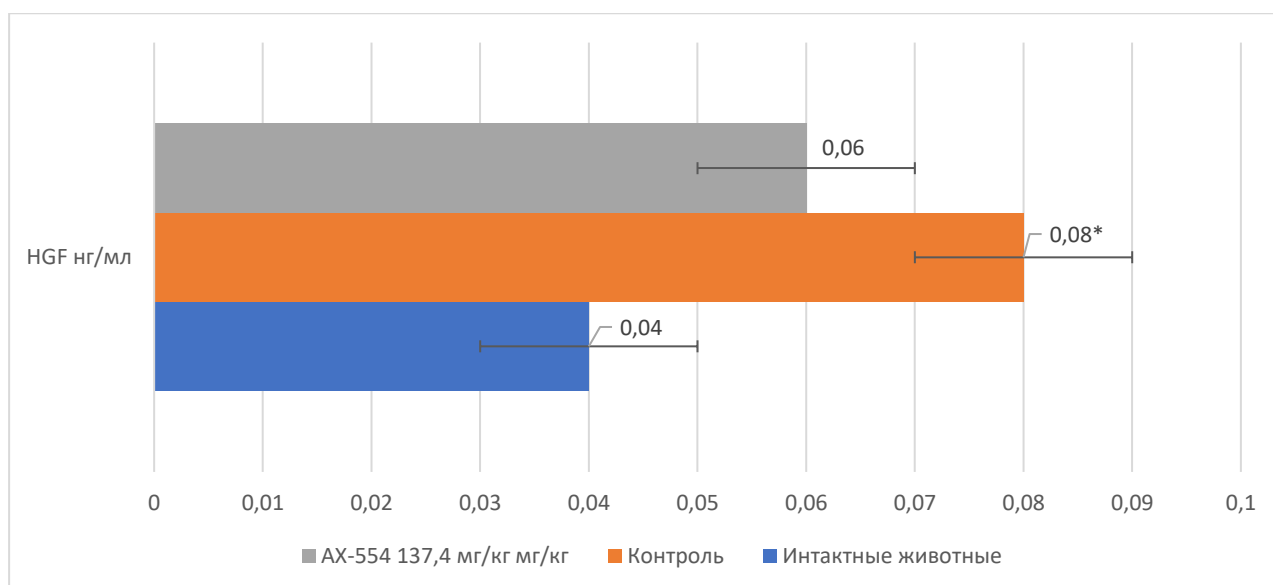


Рисунок 6. Динамика полимеризации тубулина в *in vitro* модельной системе

Таким образом, на основании проведенных исследований мы можем сделать заключение, что АХ-554 в терапевтических дозах и эффективной концентрации снижает как синтез тубулина-бета 3 в опухолевых клетках, так и его полимеризацию, что приводит к нарушению процессов клеточного деления.

Изучили влияние курсового 7-суточного введения АХ-554 на тканевое содержание с-МЕТ (мезенхимально-эпителиальный фактор трансформации) в ткани ксенографтной опухоли легкого (рисунок 7) по уровню продукта его активации – HGF. Внутривенное введение АХ-554 в средней терапевтической дозе оказывало снижающий эффект при этом статистических различий ни с контролем, ни с интактными животными получено не было.

По современным представлениям экспрессия мезенхимального трансформирующего фактора опухолевыми клетками свидетельствует о формировании фармакорезистентности ткани опухоли к классическим, в первую очередь, химиотерапевтическим средствам.



Примечание: * - различия при сравнении с интактными животными значимы при $p < 0,05$ (ANOVA, критерий Ньюмена-Кейлса)

Рисунок 7. Уровни HGF в гомогенате опухолевой ткани на фоне 7-суточного введения AX-554 в средне-терапевтической дозе

Двукратное увеличение экспрессии в ксенографтной опухоли по сравнению с легкими интактных животных не может служить доказательством развивающейся фармакорезистентности в силу того, что материал опухоли был получен из первичных опухолевых узлов пациентов, ранее не получавших специфического лекарственного воздействия. Полученные результаты влияния AX-554 на экспрессию маркера в опухолевой ткани доказывают это наше предположение: нами не получено значимых отличий концентрации продукта активации c-MET в группе животных, получавших AX-554 при их сравнении ни с интактными, ни с контрольными животными.

Влияние AX-554 на процессы программируемой гибели опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого в средне-терапевтической дозе 137,6 мг/кг/сутки. На 21 сутки после прекращения введения у выведенных из эксперимента мышей срезы извлеченных опухолей окрашивали anti-Caspasa-3 и anti-Bcl-2 антителами и изучили интенсивность позитивного окрашивания препаратов животных интактной группы, контрольных мышей (не получавших никакого специфического лечения) и животных, подвергнутых терапии AX-554. Результаты представлены в таблице 1.

Курсовое внутрижелудочное введение 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата сопровождалось значительным повышением экспрессии каспазы-3 опухолевыми клетками на фоне снижения интенсивности окрашивания препаратов опухоли на Bcl-2. Полученные результаты

доказывают наличие апоптогенного компонента в механизме действия исследуемого соединения АХ-554.

На заключительном этапе работы изучили системную кинетику АХ-554 при внутривенном введении, а также биодоступность и концентрацию вещества в легочной ткани животных при внутрижелудочном введении соединения.

Таблица 1. Интенсивность положительной реакции клеток немелкоклеточного рака легкого при окрашивании антителами к каспазе 3 и Bcl-2 на фоне курсового введения АХ-554

| № п/п | Экспериментальная группа | n | Интенсивность окрашивания, %, M±MSE | |
|-------|------------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------|
| | | | Bcl-2 | Каспаза-3 |
| 1. | Интактные легкие | | 26,4±2,3 | 13,5±1,7 |
| 2. | Нелеченая опухоль (контроль) | | 59,4±3,2* | 3,8±1,2* |
| | | | p=0,001 | p=0,001 |
| 3. | АХ-554 137,6 мг/кг/сут | | 12,6±1,5 ^a | 37,9±2,1 ^a |
| | | | p=0,001 | p=0,001 |

Примечание: * - различия при сравнении с интенсивностью окрашивания препаратов интактных легких статистически достоверны (ANOVA, критерий t Стьюдента); ^a – различия при сравнении с интактными легкими и с препаратами животных, не получавших специфической терапии достоверны (ANOVA, критерий Тьюки)

Анализируя фармакокинетические кривые АХ-554 в плазме, можно отметить следующее. Биэкспоненциальный характер фармакокинетической кривой свидетельствовал о наличии, как минимум, двух механизмов элиминации АХ-554 из кровотока как при внутривенном, так и при внутрижелудочном введении. Альфа-фаза элиминации, характеризующаяся весьма коротким периодом полувыведения, может быть связана с быстрым поступлением препарата в ткани, а также связыванием с различными органическими соединениями. В бета-фазу снижение концентрации АХ-554, вероятно, обусловлено более медленными метаболическими превращениями и почечной экскрецией не связанного с белками вещества в условиях установившегося квазистационарного состояния. При введении АХ-554 кроликам внутривенно и внутрижелудочно в дозах, пропорциональных минимально-действующей, средне-терапевтической и высшей терапевтической установлена линейная зависимость между введенными дозами и фармакокинетическими параметрами C_{max} и AUC_{0-t} .

При внутрижелудочном введении АХ-554 вне зависимости от введенной дозы быстро всасывается в системный кровоток, достигая пиковой концентрации в плазме к 2 часам (рисунок 8). Абсолютная биодоступность АХ-554, введенного в виде фармацевтической субстанции, составила для введенной дозы 5,8 мг/кг (соответствует минимально-действующей) 97,5%, для дозы 37,4 мг/кг (соответствует средне-терапевтической дозе) – 91,6%, для высшей терапевтической дозы (в пересчете на кролика 104,3 мг/кг) – 90,7%. Следовательно,

биодоступность АХ-554 в виде фармацевтической субстанции при внутрижелудочном введении, составляет более 90%. Соединение при внутрижелудочном введении накапливается в ткани легких и определяется более 5 ч в концентрациях, превышающих IC_{50} .

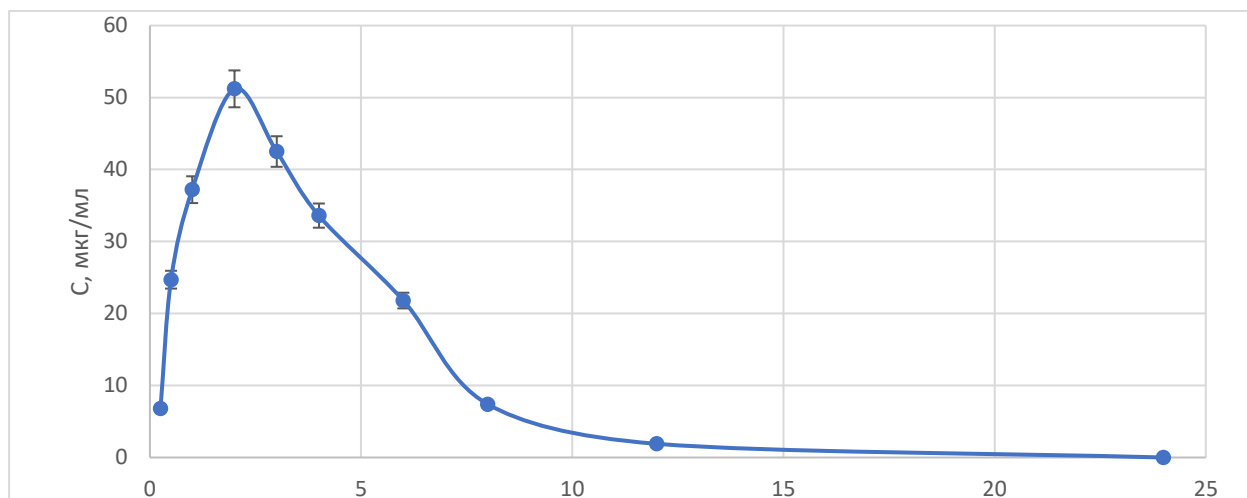


Рисунок 8. Фармакокинетические кривые АХ-554 при однократном внутрижелудочном введении кроликам в дозе 104,3 мг/кг в линейных координатах

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного диссертационного исследования

На оригинальной ксенографтной модели человеческого немелкоклеточного рака легкого с использованием в качестве акцептора атимических иммунодефицитных облученных мышей-самок BALB/c nu/nu с пересаженными человеческими лимфоцитами установлен механизм противобластомного действия 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаната (АХ-554) на основе 4-аминохромена. При курсовом 7-суточном внутрижелудочном введении в средне-терапевтической дозе исследуемое вещество активирует апоптоз и аутофагию опухолевых клеток. Исследуемое соединение 4-аминохромена АХ-554 подавляет процесс клеточного деления за счет снижения продукции и полимеризации бета-тубулина класса 3. Соединение 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3] диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитри-ла N-ацетил-аминоэтанат не вызывает формирования фармакорезистентности. При внутрижелудочном введении в диапазоне доз от минимально-действующей до высшей терапевтической создает в крови и ткани легких концентрации, превышающие значение IC_{50} , установленные в культуре клеток, сохраняющиеся более 5 часов. Совокупность полученных данных свидетельствует о наличии в механизме действия АХ-554 антипролиферативного, антиметастатического компонентов, способности активировать программируемую гибель опухолевых клеток и, в совокупности с ранее полученными данными о хронической токсичности вещества, прогнозировать его относительную безопасность.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В свете полученных результатов наиболее перспективными направлениями развития темы настоящего диссертационного исследования являются фундаментальное и прикладное. В рамках первого было бы чрезвычайно актуальным и важным изучить активность и механизмы противоопухолевого действия АХ-554 на других моделях злокачественных новообразований, представляющих большую проблему с точки зрения выбора оптимальных химиотерапевтических стратегий. Кроме того, не останавливаясь на имеющихся сведениях о точках приложения действия 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3] диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаната большой научный интерес представляет исследование влияния вещества и на другие важнейшие внутриклеточные сигнальные пути, в частности опосредуемые семейством киназ МАРК. Прикладная перспектива полученных результатов видится в продолжении исследований готовой лекарственной формы АХ-554, позиционирование вещества как кандидата в отечественное лекарственное средство для лечения чувствительных форм немелкоклеточного рака легких.

ВЫВОДЫ

1. Для изучения фармакологических свойств АХ-554 и других перспективных противоопухолевых молекул в опытах *in vivo*, максимально приближенных к условиям человеческого организма, разработана уникальная биологическая платформа ксенографтной модели человеческого немелкоклеточного рака легкого с использованием в качестве акцептора гуманизированных атимических иммунодефицитных мышей-самок BALB/c nu/nu с пересаженными человеческими лимфоцитами.

2. При внутрижелудочном курсовом 7-суточном введении в дозах 21,2 мг/кг, 137,6 мг/кг и 384,0 мг/кг, соответствующих минимально-действующей, средне-терапевтической и высшей терапевтической, АХ-554 ингибирует на 25% и более рост ксенографтной опухоли, подавляет ее метастазирование; в высшей терапевтической дозе вызывает ремиссию злокачественного процесса у 4 животных из группы (20% наблюдений, $p=0,005$). Установлено, что 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтанат не вызывает формирования химиорезистентности.

3. При курсовом 7-суточном внутрижелудочном введении в средне-терапевтической дозе 137,6 мг/кг АХ-554 повышает при сравнении с контрольными животными экспрессию каспазы-3 до $37,9 \pm 2,1$ (в 10 раз) и снижает экспрессию Bcl-2 до $12,6 \pm 1,5$ (в 4,8 раза) и, тем самым, активирует апоптоз опухолевых клеток немелкоклеточной карциномы легкого.

4. Внутрижелудочное семисуточное введение АХ-554 сопровождается дозозависимым подавлением экспрессии рецепторной тирозинкиназы анапластической лимфомы (PI3K/ALK) в

опухолевых клетках: в среднем до 1,17 нг/мл в ВТД, до 2,81 нг/мл в СТД и до 4,67 нг/мл в МДД, что доказывает способность вещества активировать процессы аутофагии опухолевых клеток, и, таким образом, тормозить опухолевую прогрессию.

5. В основе антипролиферативного действия 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаната лежит снижение продукции структурного компонента микротрубочек – бета-тубулина класса 3 в диапазоне от 3,4 нг/мл до 13,5 нг/мл в зависимости от вводимой дозы. Инкубация АХ-554 в эффективной противоопухолевой концентрации 2×10^{-7} М в препарате тубулина-мономера головного мозга быка на 31,2% ингибирует скорость полимеризации тубулина ($p=0,001$ при сравнении с группой контроля).

6. При внутрижелудочном введении 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтанат в диапазоне доз от минимально-действующей до высшей терапевтической биодоступность вещества превышает 90%; при этом на фоне введения СТД вещества в крови и ткани легких создаются концентрации равные 13,78 и 9,20 мкг/мл соответственно, превышающие значение IC_{50} , установленные в культуре клеток, сохраняющиеся в крови – более 5 часов и в ткани легких – более 6,18 часов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для изучения фармакологических свойств перспективных веществ, обладающих противоопухолевой активностью, может быть использована биологическая *in vivo* платформа, представляющая собой атимических иммунодефицитных мышей-самок BALB/c nu/nu, гуманизированных путем сублетального облучения последующей трансплантацией человеческих лимфоцитов, и гетеротопической инокуляцией опухолевой ткани.

2. При планировании доклинических исследований противоопухолевой активности готовой лекарственной формы АХ-554 рекомендуется использовать внутрижелудочный путь введения, позволяющий достигать оптимальных показателей терапевтической эффективности и создавать эффективные концентрации в плазме крови и органе-мишени.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Novel aminochromone derivative inhibits tumor growth on xenograft model of lung cancer in mice/ Ekaterina V. Blinova, Marina O. Dudina, Irina R. Suslova, Elena A. Samishina, Dmitry S. Blinov, Dmitry A. Roshchin // **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**. – 2018. – Vol. 9(4). – P. 130-134.
2. Molecular and cellular mechanisms of acute cytotoxic liver damage as potential biological targets for magnesium-containing cell-protective drug / Marina O. Dudina, Irina R. Suslova, Mariya S.

Khalzova, Juliya V. Dergunova, Evgeniya A. Kogan, Dmitry A. Roshchin, Elena A. Samyshina, Mikhail A. Morozov, Sergey S. Dydykin // **Research Results in Pharmacology**. – 2018. –Vol. 4(3). – P. 9-15.

3. Патогенетические аспекты антибластомной активности производного аминохромена на модели карциномы легкого / Т.А. Зобнина, А.И. Максимкин, М.О. Краско, М.О. Дудина, И.Р. Сусллова // Вестник «Биомедицина и социология». – 2019. – Том.4(1). – С.101-112.

4. К вопросу о безопасности 4-алкил-замещенного соединения с противоопухолевым действием / М.О. Дудина, Е.В. Блинова, И.Я. Моисеева, Е.А. Самышина, И.Р. Сусллова, Д.С. Блинов // **Кубанский научный медицинский вестник**. – 2019. – Т. 26, №1. – С. 101-107.

5. К вопросу противоопухолевого действия 4-алкил-замещенного соединения аминохромена / Е.В. Блинова, М.О. Дудина, О.Н. Дерябина, И.Р. Сусллова, Е.А. Самышина, С.Я. Скачилова, В.И. Шаробаро // Мат. XXVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2019. – С. 62.

6. 4-алкил-замещенное производное 2-аминохромена подавляет рост и метастазирование ксенографтной аденокарциномы легкого / Е.А. Самышина, М.О. Дудина, Е.В. Блинова, И.Р. Сусллова, О.Н. Дерябина, Д.С. Блинов, П.Н. Жданов, В.И. Шаробаро // Сеченовский Вестник. – 2019. – Т. 2(2). – С. 15-20.

7. Patient-Derived Non-Muscular Invasive Bladder Cancer Xenografts of Main Molecular Subtypes of the Tumor for Anti-Pd-11 Treatment Assessment/ E. Blinova, D. Roshchin, E. Kogan, E. Samishina, T. Demura, O. Deryabina, I. Suslova, D. Blinov, P. Zhdanov, U. Osmanov, M. Nelipa, A. Kaprin // **Cells**. – 2019. – Vol.8(6). –P.1-17.

8. Programmed death-ligand 1 signaling pathway involves in bladder cancer growth and progression/ Elena A. Samishina, Ekaterina V. Blinova, Dmitry A. Roshchin, Irina A. Suslova, Dmitry S. Blinov, Pavel N. Zhdanov, Olga N. Deryabina, Olesia V. Kit'ko // **Journal of Carcinogenesis**. – 2019. – Vol.18(1). –P.3-10.

9. Development of patient-derived PD-L1-expressing grade 2 non-muscular invasive bladder cancer in NOG/SCID female mice/ E. Blinova, D. Roshchin, E. Samishina, I. Suslova, O. Deryabina, P. Zhdanov, D. Blinov, A. Chudaikin, T. Bogoyavlenskaya, Yu. Vasiliev // **Journal of anatomy**. – 2020. Vol. 236, Suppl. 1. – P. 139-140.

10. Репродуктивная и эмбриотоксикологическая характеристика нового противоопухолевого соединения - производного 4-аминохромена /М.О. Дудина, М.О. Краско, Е.В. Блинова, И.Р. Сусллова, Е.А. Самышина, Д.С. Блинов, С.Я. Скачилова // **Вестник биомедицина и социология**. – 2020. – Т. 5, № 1. – С. 17-22.

11. Изучение безопасности производного аминохромена, обладающего противоопухолевой активностью / Е.В. Блинова, М.О. Дудина, И.Р. Сусллова, М.О. Краско, О.Н. Дерябина, Д.С.

Блинов, С.Я. Скачилова, Е.А. Самышина// Мат. XXVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., 2020. – С. 5.

Патент

12. Производные 2-аминохроменов проявляющие противоопухолевую активность. Фармацевтические композиции: пат. №2704262 Рос. Федерация / Скачилова София Яковлевна, Ермакова Галина Александровна, Блинова Екатерина Валериевна, Блинов Дмитрий Сергеевич, Проскурина Оксана Владимировна, Шилова Елена Владимировна, Шилова Александра Михайловна, Алешина Валентина Алексеевна, Самышина Елена Александровна, **Сулова Ирина Рудольфовна**, Желтухин Николай Константинович, Симакина Екатерина Александровна, Коротоножкин Алексей Викторович, заявитель и патентообладатель — Акционерное общество "Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ" АО "ВНЦ БАВ", заявл. №201814683027.12.2018, опубликовано 25.10.2019. Бюл. №30, 2 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВТД – высшая терапевтическая доза

ИГХ – иммуногистохимия

ИФА – иммуноферментный анализ

МДД – минимально-действующая доза

СТД – средне-терапевтическая доза

ТРО – торможение роста опухоли

IC₅₀ – эффективная подавляющая концентрация

TUBB3 – тубулин-бета 3