

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

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  
(медицинские науки)

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель –**  
доктор медицинских наук, доцент  
**Е.В. Блинова**

Москва – 2020

# СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЕЩЕСТВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ.....	16
1.1 Химическая классификация веществ природного происхождения, обладающих противоопухолевым действием.....	17
1.2 Ключевые механизмы реализации противобластомного действия препаратов природного происхождения.....	19
1.2.1 Ингибиторы роста и антитубулиновые агенты.....	20
1.2.2 Индукторы апоптоза и аутофагии.....	22
1.2.3 Ингибиторы ангиогенеза, миграции, инвазии и метастазирования.....	24
1.2.4 Природные ингибиторы митоген-активирующих протеинкиназ.....	27
1.3 Кумарины – перспективный класс биологически активных веществ для поиска противоопухолевых средств.....	30
1.3.1 Противоопухолевая активность натуральных кумаринов.....	32
1.3.2 Антибластомные свойства полусинтетических и синтетических кумаринов.....	35
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1 Соответствие исследования требованиям гуманного обращения с животными и иным биоэтическим установлениям.....	39
2.2 Дизайн диссертационного исследования.....	41
2.3 Характеристика исследуемого производного аминохромена и референтных противоопухолевых препаратов.....	42
2.4 Животные, использованные для формирования модели ксенографта и при проведении фармакокинетических исследований.....	44
2.5 Разработка ксенографтной гетеротопической модели немелкоклеточного рака легкого.....	45

2.6 Иммуноферментный метод исследования.....	48
2.7 Иммуногистохимическое исследование.....	49
2.8 <i>In vitro</i> метод изучения влияния АХ-554 на полимеризацию тубулина....	50
2.9 Аналитический метод определения АХ-554 в крови и легких животных	50
2.10 Статистические методы анализа полученных результатов .....	52
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	53
3. МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ АХ-554 В ОТНОШЕНИИ КСЕНОГРАФТНОГО НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО .....	53
3.1 Результаты исследования противоопухолевой и антиметастатической активности АХ-554 на модели гетеротопического ксенографта рака легкого .....	53
3.2 Результаты исследования влияния АХ-554 на тканевую экспрессию рецепторной тирозинкиназы (ALK) в опухоли.....	57
3.3 Результаты определения тканевой концентрации тубулина бета III в опухоли на фоне курсового введения АХ-554.....	58
3.4 Влияние АХ-554 в диапазоне концентраций на полимеризацию тубулина в опытах <i>in vitro</i> .....	60
3.5 Результаты исследования экспрессии с-MET в ткани опухоли под действием АХ-554.....	61
3.6 Исследование влияния АХ-554 на активность программируемой гибели клеток ксенографтной опухоли .....	63
4. СИСТЕМНАЯ КИНЕТИКА И БИОДОСТУПНОСТЬ АХ-554. ТКАНЕВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ВЕЩЕСТВА В ЛЕГКИХ .....	67
4.1 Системная кинетика АХ-554 при внутривенном введении кроликам .....	67
4.2 Биодоступность и кинетика АХ-554 при внутрижелудочном введении кроликам .....	72
4.3 Тканевая концентрация АХ-554 в ткани легкого при однократном внутрижелудочном введении.....	77
5.1 Итоги выполнения диссертационного исследования.....	87

5.2 Перспективы дальнейшего развития темы диссертации .....	88
ВЫВОДЫ.....	89
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	91
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....	92
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ .....	121
ПРИЛОЖЕНИЯ .....	122

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **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 [1, 2].

Последние годы были ознаменованы существенными достижениями в области хирургической онкологии, лучевой терапии и онкофармакологии [3], включая создание нового – иммунобиологического подхода в терапии опухолевых процессов [4]. При этом, в современной онкологии сохраняются серьезные фундаментальные и прикладные проблемы, позволяющие злокачественным опухолям сохранять свою актуальность и значимость, и требующие неординарных решений. Первая связана с тем, что злокачественная опухоль – это гетерогенная структура, состоящая из множества различных клеточных популяций [5]. 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 [6]. С этим связан и все возрастающий запрос на разработку новых, оригинальных молекул.

Тридцать лет назад главным подходом к созданию новых антибластных лекарственных средств были методы комбинаторного химического синтеза, позволявшие за счет оптимизации технологического

процесса получить множество веществ [7]. Однако, за последние годы тренд в области изыскания новых молекул сдвинулся в область более глубокого изучения свойств природных веществ. В частности, одна треть из двадцати лидеров продаж на мировом рынке лекарств имеет природное происхождение [8, 9], 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 [10]. 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 [11]. В этой связи наше внимание привлеч весьма широкий с 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-карбонитрила N-ацетил-аминоэтанойл. 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 [12-16].

Наряду со значительной антибластомной активностью коллективом авторов также была установлена высокая безопасность системного перораль-

ного применения соединения. В частности, коллеги определили, что производное хромена относится к малотоксичным соединениям, при курсовом введении не обладает алергизирующим, 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-аминоэтаноат безусловно привлекательным как потенциальный кандидат в лекарственное средство.

Вместе с этим, детальное изучение 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-метокси-бензо[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 терапевтических 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 опухоле-

вых 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 клеточного деления 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  $2 \times 10^{-7}$  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-аминохромона 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-карбо-нитрила N-ацетил-аминоэтаната 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-аминоэтаната, 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 белка при его инкубации с АХ-554 в IC<sub>50</sub>. Состояние программируемой гибели клеток опухоли животных, получавших АХ-554, оценивали методом иммунохистохимического 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 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.

# 1. СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЕЩЕСТВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ

Вещества природного происхождения, особенно вторичные метаболиты растений и микроорганизмов в течение многих лет выступают в качестве источников создания лекарственных средств, при этом, открытие аспирина, морфина, пенициллина, разделило исторические эпохи продолжительности и качества жизни на «до» и «после». Даже теперь, в так называемую эру рака, такие природные агенты, как адриамицин и паклитаксел каждодневно применяются в терапии злокачественных новообразований [17]. Помимо растений, произрастающих на суше, морская экосистема также рассматривается в настоящее время как безграничный ресурс для новых и эффективных фармакологических веществ [18]. Крупные достижения в области переработки и биотехнологий наряду с развитием аналитической химии, спектроскопии и высокоспецифичных и чувствительных скрининговых методов открывают широкие горизонты для использования биологических источников в создании эффективных лекарственных средств.

Биофармакология как наука сравнительно молодая отрасль знаний, использующая в качестве предмета для разработки лекарства биологический объект. За последние 20 лет были проведены широкомасштабные скрининговые исследования, позволившие обнаружить вещества с противовирусной [19], антибактериальной [20], противогрибковой [21], противопаразитарной [22], противоопухолевой [23] и противовоспалительной [24] активностью. Кроме того, существенно пополнился выбор молекул для косметологии и пищевой индустрии [25]. Были открыты и описаны эффективные средства для борьбы с антибиотикорезистентностью на основе уникальных химических структур [26]. При этом, следует подчеркнуть, что при анализе на долю морских растений приходится более 72% новых соединений [27].

## 1.1 Химическая классификация веществ природного происхождения, обладающих противоопухолевым действием

Многочисленные попытки классифицировать вещества природного происхождения по их химической структуре предпринимались [28-32], однако, следует заметить, что наиболее удобным подходом, с нашей точки зрения, является разделение их на алкалоиды, поликетиды, пептиды и углеводы.

*Алкалоиды* представляют собой чрезвычайно разнообразную группу веществ, широко представленную в живой природе. Pelletier соавт. определили алкалоиды как «циклические органические соединения, содержащие азот в окисленном состоянии, который редко встречается среди живых организмов» [30]. В зависимости от химической структуры, биологической активности, пути биосинтеза и гетеро- или негетероциклического состава предложено несколько классификаций алкалоидов [33]. В частности, Kumar et al. [34] разделял алкалоиды на семь подклассов: пиридоакринные, индоловые, пирроловые, изохинолиновые, гуадининовые, аминокимнолиновые и стероловые алкалоиды [35, 36]. У алкалоидов описаны такие виды биологической активности, как цитотоксическая [37, 38], антилейкемическая [39], противомаларийная [40] и антимикробная [41].

*Поликетиды* образуют очень разнообразный по структуре (макролиды, полиэферы, полиолы и ароматические вещества) и активности класс природных веществ с фармакологическим действием. Будучи веществами, насыщенными кислородом [35], они могут содержать множественные  $\beta$ -гидрокетоновые или  $\beta$ -гидроксиальдегидные функциональные группы. По своей структуре они напоминают жирные кислоты: во-первых, поскольку синтезируются путем декарбоксилирующей конденсацией малонил-КоА и других коэнзимов, однако, в случае с поликетидами, более, чем один тип мономера может быть использован для конструкции ароматической группы или ароматического кольца. Во-вторых, так же как жирные кислоты поликетиды ассоциированы с большим числом естественных клеточных функций, вместе с тем поликетиды

более сложно синтезируемые молекулы [42, 43]. Поликетиды обладают противомикробной, противоопухолевой, противогрибковой, антипротозойной и нейротоксической активностью [35].

*Терпены* являются конечным продуктом биосинтеза, включающего пятиуглеродную изопреновую структуру. В зависимости от числа циклов терпены классифицируются на монотерпены, сесквитерпены, дитерпены, сестертерпены, тритерпены (стероиды) и тетратерпены (каротиноиды) [35, 44]. Терпенам присуща цитотоксическая, антипролиферативная, противогрибковая и антимикробная активность [45].

*Пептиды* – источники азота и аминокислот представляют собой последовательности от 2 до 20 аминокислотных остатков и обладают целым рядом потенциальных биологически активных функций. Биоактивные пептиды могут приобретать активность и в случае разрушения материнской белковой молекулы [46]. Первый вид активности, открытый у пептидов, был связан с нейротоксическими свойствами молекулы; к настоящему времени у них описаны кардиотоническое, противовирусное, кардиотоксическое и противомикробное действие [47]. В сочетании с великолепной способностью к связыванию, низкой токсичностью помимо участка воздействия и высокой стабильностью перечисленные фармакологические свойства делают пептиды многообещающей мишенью для создания новых лекарственных средств [48]. В частности, до 60% всех описанных биологических молекул относится к классу пептидов [49].

*Карбогидраты*, также весьма разнообразных класс природных биологически активных веществ. Среди них наибольшее распространение получили полисахариды и молекулы небольшого молекулярного веса, олигосахариды [35, 50]. Большим структурным разнообразием отличаются полисахариды, представляющие собой сложные последовательности моносахаристых остатков [51]. Эти вещества чрезвычайно широко используются в производстве биогелей, систем доставки лекарственных веществ, ранозаживляющих систем,

тканевой инженерии и разработке мембран для гемодиализа. Кроме того, у полисахаридов выявлены антимуtagenные, антибластомные, гипохолестеринемические и антикоагулянтные свойства [52]. Природные олигосахариды получают путем гидролиза полисахаридов и содержат от 10 до 12 моносахаридных остатков, однако, в ряде случаев могут состоять из 30 и более элементов (как рамногалактуронаны) [53]. В силу своей сложной и гетерогенной структуры олигосахариды вовлечены в реализацию большого спектра биологических функций, при этом до настоящего времени не получено данных о противоопухолевом действии олигосахаридов [54].

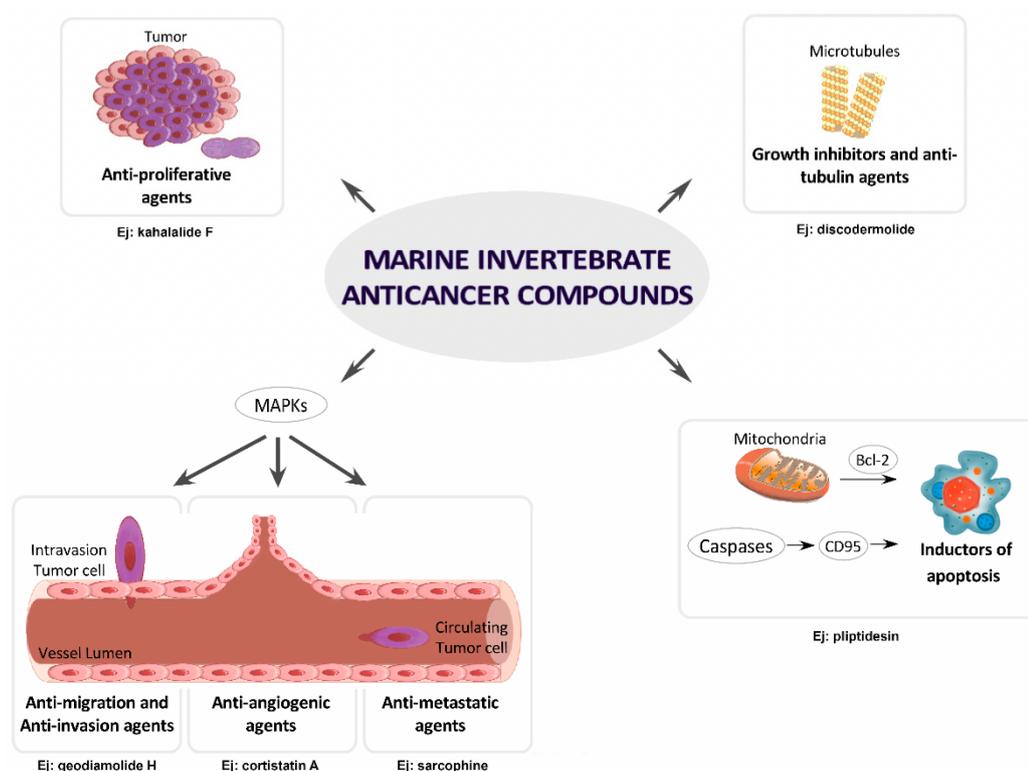
К классу углеводов принадлежат и гликозиды. По химической структуре они имеют сахаристую и гликозидную связи между функциональными группировками. В связи с чем имеют сахаристую и агликоновую части в своем составе [55]. К этому же классу относятся гликозаминогликаны [56, 57].

К углеводам принадлежат структурно и нуклеозиды. Среди них цитарабин и гемцитабин имеют структурное подобие с цитозином, в связи с чем ингибируют синтез ДНК, встраиваясь в синтезирующуюся цепь ДНК и приводя к нарушению процесса удлинения цепи и ее фрагментации.

## **1.2 Ключевые механизмы реализации противобластомного действия препаратов природного происхождения**

Нормальные клетки приобретают свойства злокачественности в результате широкомасштабных генетических изменений, что и приводит к формированию огромного количества типов злокачественных новообразований [58]. Вместе с тем, большинство типов опухолей обладают определенными общими признаками, которые должны учитываться при разработке эффективных противоопухолевых лекарственных средств. Hanahan and Weinberg идентифицировали шесть главных таргетов в человеческих опухолях: самодостаточность в сигнализации роста, нечувствительность к ингибирующим рост сигналам,

избегание программируемой гибели (апоптоза), нелимитированный репликативный потенциал, поддерживаемый ангиогенез, инвазивность и метастазирование [59]. В этой связи, в рамках настоящего обзора мы попытались ранжировать противоопухолевые вещества природного происхождения по принципу преимущественного механизма действия: ингибиторы роста и антитубулиновые агенты, индукторы апоптоза и аутофагии, антиангиогенные, вещества, подавляющие миграцию, инвазию и метастазирование. Кроме того, большое значение сейчас придается препаратам – блокаторам митоген-активируемых протеинкиназ (рис. 1).



**Рисунок 1.** Основные направления реализации противоопухолевой активности веществ природного происхождения по [60] в ред. автора

### 1.2.1 Ингибиторы роста и антитубулиновые агенты

Микротрубочки являются составной частью цитоскелета и построены из белка тубулина. Основная функция описываемых компонентов заключается в

придании эукариотической клетке определенной формы, участие в транспорте молекул и внутриклеточной сигнализации, поддержке гомеостаза митохондрий, обеспечение подвижности и внутриклеточного распределения органелл [61]. Помимо этого, система микротрубочек играет ключевую роль в клеточном делении, что делает ее важной мишенью для противоопухолевых лекарственных средств [62]. Как мы уже говорили, микротрубочки составлены из гетерополимеров  $\alpha$ -,  $\gamma$ - и  $\beta$ -тубулина по принципу голова – хвост, образующих димеры. Эти димеры поляризованы в 13 протофиламентов, которые образуют полые прочные структуры. В связи с тем, что молекулы  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина связываются с 1 молекулой ГТФ перед димеризацией, поддержание равновесия между ди- и полномерной формами тубулина является энергозависимым (ГТФ) процессом. При этом молекулы, связанные с ГТФ полимеризуются, а ГДФ-связанные молекулы тубулина остаются в свободной форме. Таким образом, ключевой молекулой, определяющей стабильность полимеризации тубулина, является ГТФ. В естественном состоянии микротрубочки и свободный тубулин существуют в виде очень динамичной среды, подверженной внешним воздействиям [63]. Противоопухолевые вещества могут нарушать равновесное состояние микротрубочек, ингибируя митотическое веретено и действуя как антимитотические агенты [64]. Антимитотические средства, воздействующие на микротрубочки, можно разделить на дестабилизирующие и стабилизирующие (рис. 1). Винка-алкалоиды (винбластин, винкристин, винорелбин, виндесин и винфлурин), криптофицины, халихондрины, эстрамустин, колхицин и комбрестатин относятся к дестабилизирующим микротрубочки агентам, поскольку в высоких концентрациях они ингибируют полимеризацию микротрубочек. Паклитаксел, доцетаксел, эпотилоны и дискодермолиды стимулируют полимеризацию микротрубочек и потому относятся к стабилизирующим веществам [65, 66]. Вещества с подобным механизмом действия являются важными противоопухолевыми средствами и применяются для лечения рака молочной железы, легких и яичников [67-86].

### 1.2.2 Индукторы апоптоза и аутофагии

В живых организмах процесс программируемой клеточной гибели, знаменуя терминальную фазу клеточной жизни, вовлечен в различные явления, такие как морфогенез, поддержание тканевого гомеостаза и элиминацию поврежденных клеток. Дисфункция программируемой гибели клеток и накопление генетических ошибок позволяет злокачественным клеткам выживать и распространяться – мигрировать. Программируемая гибель может быть категоризована на три процесса: апоптоз, аутофагия, и вариантная форма апоптоза, называемая некроптозом [87, 88].

Апоптоз включает генетически запрограммированную элиминацию клеток [89] и представляет собой один фундаментальных процессов развития, физиологии и гомеостаза. Любое нарушение в балансе про- и антиапоптотических механизмов может сопровождаться широким спектром нарушений, в том числе и малигнизацией [90].

В организме млекопитающих в результате последних исследований идентифицированы две ведущих сигнальных системы, заканчивающихся активацией каспаз и запуском апоптоза (рис. 1). К ним относится внутренний путь активации, митохондриальной гибели [91], и внешний путь активации, или путь гибели рецепторов [92]. Оба пути сходятся на активации каспазы-3 и последующих дефрагментации ДНК, деградации цитоскелета и ядерных белков, перекрестном связывании протеинов, формировании апоптотических телец, выработки лигандов – активаторов фагоцитирующих клеток и поглощении фагоцитами [93]. При этом, внутренний путь запускается внутриклеточным стрессом, накоплением реактивных форм кислорода, радиоактивным излучением, редукцией факторов роста, снижением продукции цитокинов и воздействием цитотоксических лекарственных средств. Этот процесс контролируется семейством Bcl-2 протеинов [94], которые приводят к выходу цитохрома с из митохондрий в цитозоль, генерации апоптосомы – молекулярной платформы для активации каспазы-9, которая в последующем активирует каспазы-3 и 7. Во внешний путь не вовлекаются митохондрии, он запускается через

поверхностные клеточные рецепторы, такие как CD-95 (Apo-1, Fas), TRAIL, и рецепторы фактора некроза опухолей.

Аутофагия, эволюционно законсервированный катаболический процесс, есть не что иное, как деградация клетки для очистки от поврежденных поверхностных протеинов и органелл [95]. Часто аутофагия активируется реактивными формами кислорода, гипоксией, недостатком питательных веществ, лекарственными стимулами или повреждением эндоплазматического ретикулума. Ведущими белковыми структурами, участвующими в аутофагии, являются рапамициновый комплекс 1 (mTORC1), фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), киназа анапластической лимфомы (ALK), беклин-1 и p53 [96]. PI3K/АКТ путь является таргетом mTOR киназы: когда PI3K/АКТ активированы, аутофагия ингибируется активной mTOR. И наоборот [97].

Иаспамид, циклический депсипептид индуцирует апоптоз Т-клеток [98, 99] не только за счет активации каспазы-3 и ингибирования экспрессии Bcl-2, но также активации протеинов семейства Bax. Соединение CS5931 полипептидной природы продемонстрировало потенциальную противоопухолевую активность по дозозависимой индукции апоптоза в клетках илеоцекальной колоректальной аденокарциномы (HCT-8) [100]. Было установлено, что в опухолевых клетках соединение вызывает подавление клеточного цикла в фазу G2/M клеточного цикла, индуцирует высвобождение цитохрома с из митохондрий с последующей активацией каспаз-9 и 3. Новый алкалоид Monanchocidin A, изолированный из морской губки, представляющий собой уникальный по химической структуре поликетидный комплекс-предшественник омега-3 гидроксигирных кислот, в микромолярных концентрациях показал высокую цитотоксическую активность в отношении ряда клеточных опухолевых линий – человеческой лейкемии (THP-1), мышинной эпидермальной карциномы (JB6C141), человеческой эпителиоидной карциномы (HeLa) [101]. Противоопухолевой активностью обладают также производные тиридиноленины [102-104]. Пирролоиминохиноновые алкалоиды макалувамины, как было недавно показано,

обладают высокой цитотоксической активностью в отношении некоторых линий человеческих опухолей как в опытах *in vitro*, так и *in vivo* [105, 106]. Они ингибируют топоизомеразу-2, а синтетические аналоги данных алкалоидов индуцируют апоптоз в клетках рака яичников, в дозозависимом режиме подавляют апоптоз опухолевых клеток ксенографтных опухолей у атимических мышей (BALB/c nu/nu) [107].

### **1.2.3 Ингибиторы ангиогенеза, миграции, инвазии и метастазирования**

Ангиогенез – это естественный физиологический процесс, охватывающий не только пролиферацию, миграцию и морфогенез эндотелиальных клеток в течение формирования новых кровеносных сосудов, но также ответственный за доставку кислорода и нутриентов [108]. Ангиогенез сопровождает органогенез, восстановление поврежденных тканей и органов, участвует в циклических процессах в матке и формировании плаценты во время беременности. В процессе канцерогенеза неоангиогенез обеспечивает опухолевый рост, а также циркуляцию опухолевых клеток через кровеносное русло в другие органы (метастазирование) [109]. Ангиогенез контролируется чрезвычайно сбалансированным сочетанием стимулирующих и подавляющих стимулов. Активация ангиогенеза начинается с дестабилизации существующего сосудистого ствола, последующей пролиферацией эндотелиальных клеток и формированием новой сосудистой трубки [110]. Ключевыми регуляторами ангиогенных процессов являются эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) и его рецептор (VEGFR-2, Flk-1/KDR). Образование новых сосудов сопряжено также с внеклеточными факторами, такими как ИЛ-8, ФНО, фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), тромбоцитарный фактор роста эндотелия (PD-ECGF), ангиопоэтин-1, трансформирующий фактор роста бета-1 (TGF- $\beta$ 1), трансформирующий фактор роста-альфа (TGF- $\alpha$ ) и эпидермальный фактор роста (EGF) [111, 112]. В связи с этим, подавление VEGF-VEGFR2 сигнального пути представляется обоснованной стратегией для подавления опухолевого роста. Тем более, что VEGF гиперэкспрессирован

в ряде опухолевых клеток и является индуктором ангиогенеза, пролиферации, миграции и инвазии [113].

Метастазирование представляется, пожалуй, одним из наиболее драматичных процессов, сопровождающих канцерогенез и определяющих течение и клинический прогноз заболевания [114]. Изменения, влекущие метастатическую трансформацию опухолевых клеток, комплексны и многочисленны, но, при этом, ряд ключевых молекул определены. В отношении них возможно фармакологическое воздействие. Матриксные металлопротеазы (ММП), интегрины, ICAM-1 и экстрацеллюлярный матрикс вовлечены в метастазирование. ММП – семейство цинк-зависимых эндопептидаз, которое играет ведущую роль в деградации экстрацеллюлярного матрикса, инвазии и метастазировании опухоли. ММП2 и ММП9, разрушающие матрикс, - первые игроки, с которых начинается метастазирование [115]. Затем опухолевые клетки инфильтрируют строму и стенку сосуда и через этап экстравазации инвазируют новые ткани и органы [116].

Исследования веществ, обладающих антиангиогенным и антиметастатическим действием сейчас главным образом сфокусированы на соединениях, блокирующих протеазы, миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток, подавляющих экспрессию ангиогенных факторов роста или матриксных белков на поверхности эндотелиальных клеток (например, интегринов) [117]. Подобные вещества, безусловно, обладают огромной ценностью как потенциальные противоопухолевые агенты. Следует особо подчеркнуть, что флора и фауна – неисчерпаемые источники подобных соединений [118].

Циклодепсипептид геодиамолит Н дозозависимо ингибирует инвазию и миграционную активность человеческой линии опухоли молочной железы Hs578T (в наномолярных концентрациях). Эффект связывают с модификацией актинового цитоскелета опухолевых клеток при отсутствии воздействия на неповрежденные клетки [118]. Насыщенный пролином октапептид стилиссамид X в микромолярных концентрациях ингибирует миграцию аденокарциномы

HeLa в клеточных культурах и подавляет активность MMP-2, p50 и p65 в клетках человеческой фибросаркомы (HT1080) [119, 120].

Бромотиозиновый алкалоид суберреамоллин А в наномолярных концентрациях продемонстрировал высокую антимиграционную и антиинвазионную активность в отношении клеток высокометастазирующего фенотипа человеческого рака молочной железы MDA-MB-231 [121]. У стероидного алкалоида кортистатин А установлена антиангиогенная активность. Вещество также подавляет миграцию и формирование эндотелиальных трубок под действием стимулирующих воздействий VEGF, bFGF в концентрации 2 нМ [122]. Бромистый алкалоид аэроплизинин-1 ингибирует рост эндотелиальных клеток в культуре посредством активации апоптотического процесса, а также снижает экспрессию MMP-2 и урокиназы [123].

Макроциклические алкалоиды, содержащие спермидиноподобные структуры, мотупорамины А, В и С в культуре клеток ингибируют инвазию через базальную мембрану рака молочной железы MDA-231 и рака простаты РС-3. Наиболее активным блокатором миграции и ангиогенеза из трех перечисленных является мотупорамин С. Соединение также изменяет архитектуру цитоскелета, снижает активацию бета1-интегрина (отвечает за адгезию и инвазию опухолевых клеток) [124]. Другой макроциклический тетрамерный алкалоид бастадин 6 проявляет антиангиогенные свойства, обусловленные ингибированием VEGF-, bFGF-зависимой пролиферации эндотелиоцитов с 20-100 кратной большей селективностью в отношении человеческих фибробластов [125]. Бастадины 9 и 16 в сочетании с бастадином 6 обнаружили мощный цитотоксический и антиангиогенный эффект в отношении мышиной меланомы В16 [125]. Представленные результаты заставили исследователей предполагать у данных алкалоидов селективное антиэндотелиальное действие. Индольный алкалоид, изолированный из морского моллюска, фидианидин А существенно подавляет миграционную активность некоторых опухолей животных в микромолярных концентрациях [126]. А бромопиролловый имидазоли-

новый алкалоид скептрин подавляет клеточную подвижность в ряде опухолевых культур вследствие редукции контрактильности и связывания к актину мономеру [127].

Макролидные латрункулины А и В разрушают клеточные микрофиламенты и обладают антимиграционной активностью в отношении высоко метастазирующего человеческого рака простаты РС-3М-СТ<sup>+</sup> и мышинной меланомы В16В15в, метастазирующей в головной мозг [128-130]. К этой же группе веществ относится и лаулималид, обладающий антипролиферативным действием за счет анти-тубулиновой активности, цитотоксическими свойствами, способностью предотвращать формирование кровеносных сосудов и миграцию эндотелиальных клеток [131].

Терпеноиды также обладают противоопухолевым действием, проявляющимся в ингибировании пролиферации клеток человеческой гепатоцеллюлярной карциномы (HerG2) в микромолярных концентрациях, подавлении клеточной адгезии, миграции и инвазии. Предполагают, что в основе активности могут лежать снижение экспрессии ядерного фактора капа-В, MMP-9 и VEGF [132, 133].

Другие представители терпенов, сифоленолы А и Е демонстрируют высокую антимиграционную активность в отношении клеток метастазирующего рака молочной железы MDA-MB-231, а также формирование сосудов под действием VEGF и bFGF [134-136].

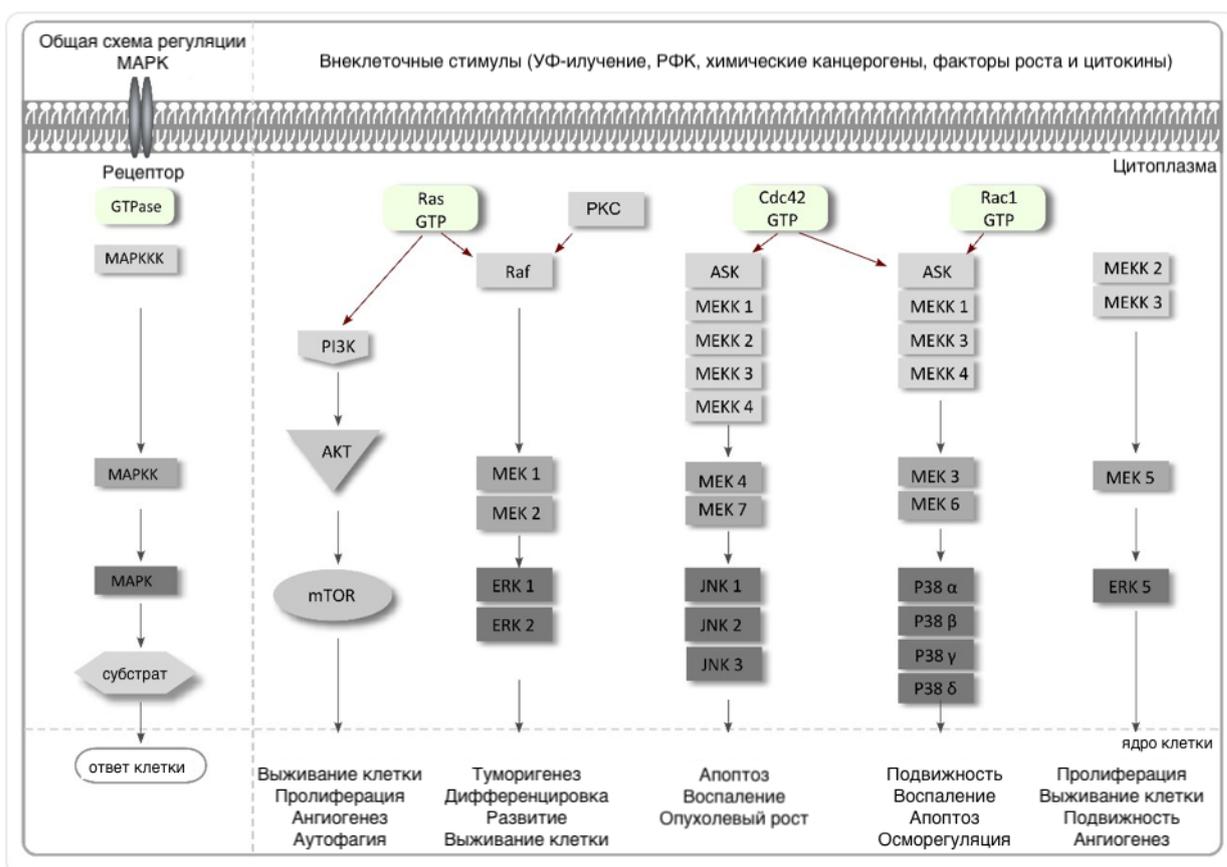
Природный сестертерпен, изолированный из морской губки, предотвращает опухолевую интравасацию через лимфо-эндотелиальный барьер на трехмерной модели рака молочной железы [137, 138].

#### **1.2.4 Природные ингибиторы митоген-активирующих протеинкиназ**

Митоген-активирующие протеинкиназы (МАРК) – семейство ферментов, специфические фосфорилирующих аминокислоты серин, треонин и тирозин, и принимающих участие в регуляции многих биологических процессов в

опухолевой клетке, в частности, регулирующих дифференцировку, пролиферацию, рост, клеточный цикл, миграцию, инвазию, метастазирование, энергетический метаболизм и ангиогенез [139]. Представители семейства активируются рядом внешних факторов и передают внутриклеточные сигналы путем фосфорилирования и последующей активации мишеней, которые, в свою очередь, достигают ядра и инициируют клеточный ответ [140] (рис. 2). Многими исследователями MAPK рассматриваются как усилители биологических сигналов, передающие разноамплитудные импульсы на активирующие и подавляющие каналы и отфильтровывающие низкоамплитудные шумы [141]. В опухолевых клетках зачастую наблюдается повышение экспрессии и функциональной активности MAPK.

В организме млекопитающих наиболее изучены MAPK/ERK киназы (MAPK/ERK), протеинкиназа С (PKC), фосфоинозитид 3-киназа (PI3K)/АКТ, c-Jun N-терминальная киназа (JNK) и p38 (рис. 2) [142]. Как известно, клеточная пролиферация и дифференцировка контролируются эпидермальным фактором роста; последний активирует рецепторные тирозинкиназы, участвующие в аутофосфорилировании и работе Ras/Raf/MEK/ERK сигнального пути [143]. PKC из семейства серин/треониновых киназ участвует в синтезе белка, экспрессии генов, пролиферации клеток, их дифференцировке, а также опухолевом росте. При разнообразных злокачественных опухолях наблюдается гиперэкспрессия многих ферментов семейства PKC [144]. PI3K/АКТ играет важную роль в выживаемости клеток и выступает как один из ключевых регуляторов онкогенеза и апоптоза. Активация ферментной системы происходит под действием мембранных рецепторов (VEGFR, PDGFR) [145]. PI3K/АКТ – перспективная мишень для разработки эффективных таргетных противоопухолевых препаратов природного и полусинтетического происхождения.



**Рисунок 2.** Участие различных киназных систем в регуляции канцерогенеза по [60] в ред. автора

Представители семейства JNK регулируют такие биологические процессы, как канцерогенез и нейродегенерацию (рис. 2). Ферменты семейства чувствительны к стрессовым стимулам, в том числе цитокинам, гамма-излучению, цитотоксическим веществам, ДНК-повреждающим агентам и реактивным формам кислорода (РФК) [146]. MAPK семейства p38 участвуют в клеточной адаптации к внешним стимулам (стресс, воспаление) и регулируют клеточный ответ на ультрафиолетовое воздействие, осмотический шок, ишемию и гипоксию, повреждение ДНК [147]. Наконец, ERK5 – наиболее часто идентифицируемый фермент семейства участвует в опухолевой трансформации и росте посредством регуляции неоангиогенеза [148].

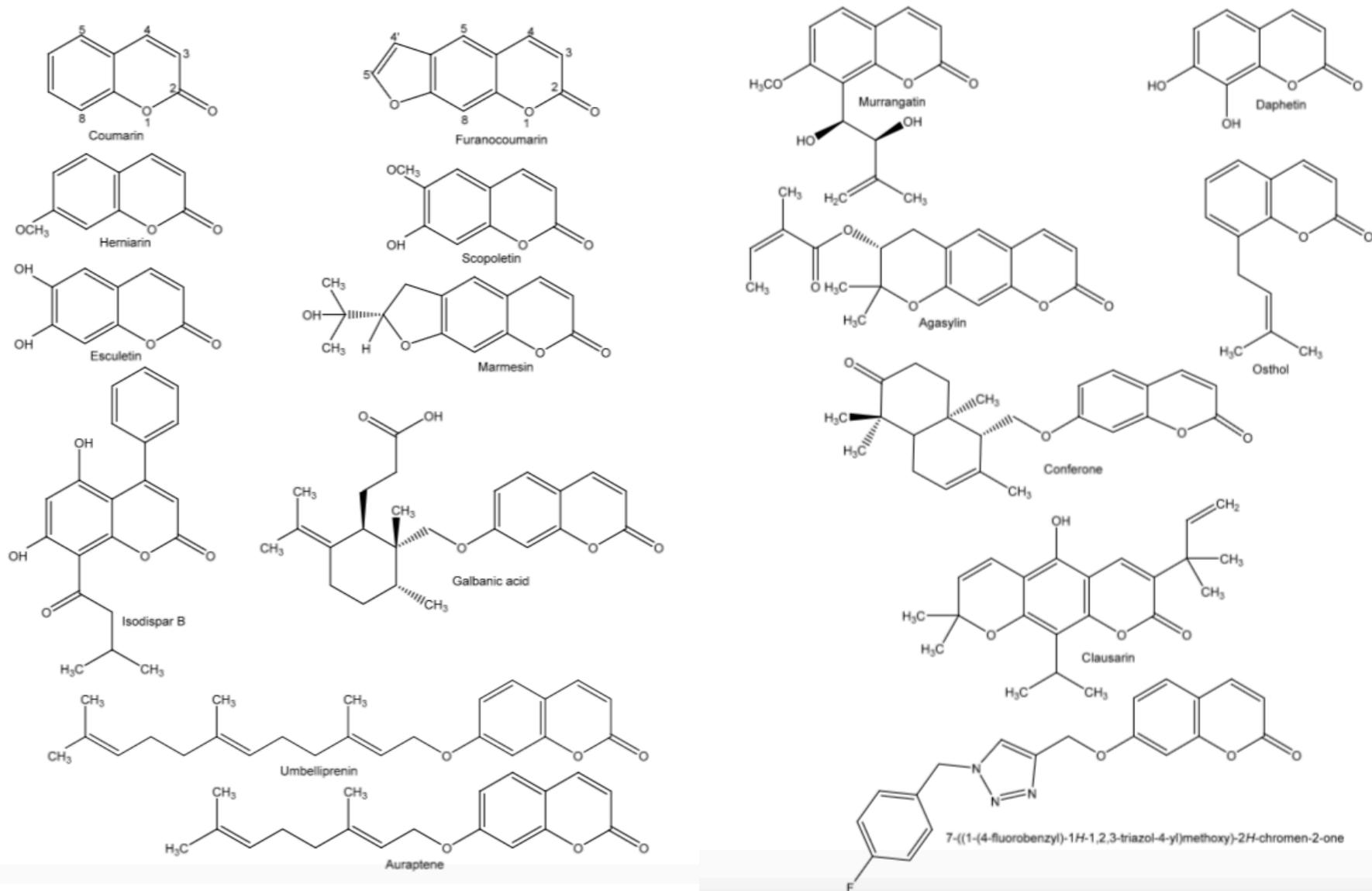
Нарушение регуляции киназ представляется одним из наиболее характерных признаков опухолевого процесса [148]. Вследствие этого, на протяжении

нии последних полутора десятилетий проводятся крупные исследования в области выявления, разработки эффективных и безопасных ингибиторов киназной активности [149]. Более 70 различных молекул, многие из которых принадлежат к продуктам живой природы, находятся на различных этапах изучения [150-152].

### **1.3 Кумарины – перспективный класс биологически активных веществ для поиска противоопухолевых средств**

Кумарин ( $C_9H_6O_2$ , 2H-1-бензопиран-2-он) и его производные (рис. 3) чрезвычайно широко представлены в растительном мире, а также могут быть получены синтетическим путем [153]. По химическому строению все они делятся на четыре большие класса: простые кумарины, такие как гепарин и скополетин, фуранокумарины, пиранокумарины и дикумарины [154-156]. Кумарины выделены из фруктов, листьев, стеблей, семян и корней представителей более 40 семейств растений [157-161].

Кумарины обладают множеством биологических эффектов, среди них антиоксидантное действие [158], противомикробная [161, 162] и противовирусная [163] активность. Были показаны анксиолитические эффекты кумаринов [164], умбеллиферону и пимпенеллину присуща активность при нейродистрофических процессах, таких как болезни Альцгеймера [165]. Коллектив под руководством Kontogiorgis синтезировали производные кумаринов на основе азометина, у которых обнаружена противовоспалительная активность [166]. 3,4-дигидро-2H-бензотиазины пока дали обезболивающее действие на модели формалинового и кислотного отека конечности животного [168]. Другие вещества класса обладают антиульцерогенным действием [169], спазмолитической [170], антикоагулянтной [171], сосудорасширяющей [172], цитотоксической и противоопухолевой активностью [173]. Вместе с тем, представителям кумаринов свойственны и нежелательные эффекты – гепатотоксичность, тошнота, нарушение стула и др. [174, 175].



**Рисунок 3.** Структура кумаринов, обладающих противоопухолевым действием по [167] в ред. автора

Многие представители класса обладают противоопухолевым эффектом [176-178]. Некоторые вещества также подавляют активность ферментов системы цитохрома P450, тем самым, нарушая биологическую трансформацию многих канцерогенов [179].

### **1.3.1 Противоопухолевая активность натуральных кумаринов**

В целом ряде работ была показана противоопухолевая активность кумаринов в отношении рака молочной железы [175], толстой кишки [180], легких [180], яичников [181], гепатоцеллюлярной карциномы [182], мочевого пузыря [183], гемобластозов [184] и других опухолей как в исследованиях в культуре клеток, так и на живых объектах. Среди лидирующих механизмов действия описаны нейтрализация свободных радикалов и антиоксидантная активность [185], подавление клеточного цикла [186], взаимодействие с различными сигнальными путями [187], ингибирование теломеразы и ангидразы [188, 189], антиангиогенная активность [190].

Так, Taniguchi et al. сообщили о наличии противоопухолевого эффекта у изолированных из листьев *Rhizophora mucronata* метоксиинофиллум Р, калокумарина В и калофилолида в отношении клеток рака шейки матки и промиелоцитарного лейкоза с IC<sub>50</sub> равной 3,8; 29,9 и 36,4 мкМ соответственно [191]. Также три эстерифицированных гемитерпеновых кумарина, изолированных из *Artemisia armeniaca* продемонстрировали цитотоксический эффект в отношении клеток HL-60 и K562 (культура хронического миелолейкоза), причем, наивысший цитотоксический эффект арменина реализовывался посредством подавления клеточного цикла [192].

Клаузарин, нордентатин, дентатин и ксантоксилетин, выделенные путем дихлорметановой экстракции из корней *Clausena harmandiana*, обладают высокую цитотоксическую активность в отношении клеточных линий гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2), колоректального рака (HCT116) и рака легкого (SK-LU-1) [193]. Кроме того, клаузарин также обнаружил выраженную анти-

оксидантную активность на 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил-гидратной модели. В рассмотренных случаях механизм фармакологического действия реализовывался посредством активации апоптоза [193].

Помимо природных агентов был синтезирован ряд полусинтетических аналогов на основе природных кумаринов с улучшенными фармакологическими свойствами. Среди таковых синтетические производные скополетина показали многообещающую противоопухолевую активность в культурах клеток человеческого рака молочной железы (линии MCF-7, MDA-MB-231) и колоректального рака (HT29) [194]. В результате подавления клеточного цикла при нарастании концентрации веществ экспоненциально повышался цитотоксический эффект в отношении указанных опухолевых клеток.

Используя биоизостерическую модель, Zang и соавт. синтезировали новые противоопухолевые аналоги гиепарварина [191]. В своей работе авторы показали, что добавление элетроноакцепторной группировки к бензольному кольцу в молекуле 7((1-(4-флуоробензил)-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метокси)-4Hхромен-4-он (рис. 3) повышает цитотоксические свойства молекулы в культуре клеток человеческой гепатомы (QGY-7701) и толстокишечной карциномы (SW480) при сравнении со структурным предшественником [195]. Сui с коллегами, кроме того, установили антибластомное действие у трех кумаринов, синтезированных на основе трифенилэтилена, в основе которого лежит ингибирование ангиогенеза [196-198].

Антиангиогенные эффекты природных кумаринов описаны в целой серии публикаций. Скополетин [199, 200], эскулетин [200], герниарин [201], декурсин и декурсинол [202], императорин [203], псоралидин [204] и др. (рис. 3) оказывают противоопухолевый эффект в том числе вследствие подавления неоангиогенеза.

Ran с соавт. показали антиангиогенные и противоопухолевые эффекты скополетина в опытах в культурах клеток и на живых организмах. В исследовании авторов соединение снижало число сосудистых ветвей через 48 часов после инкубации хорионаллантоисной мембраны куриного яйца с 100 нмоль

скополетина. Кроме того, у вещества были обнаружены антимиграционный, антипролиферативный и антиэндотелиальный эффекты на модели индукции с помощью VEGF [205].

Декурсин и декурсинол в модельной системе на трансгенных эмбрионах рыбок данио подавляли рост сосудов за счет как блокады VEGFR2, так и вследствие подавления активности ряда MAPK, в частности, p-ERK и JNK [206].

Терапевтическое действие мармезина из группы фуранокумаринов выражается в значительном подавлении экспрессии и активности MMP-2 в ответ на активацию VEGF-A. Помимо прочего, мармезин в дозозависимом режиме подавляет миграцию злокачественных клеток, их пролиферацию и опухолевую инвазию вследствие ингибирования клеточного цикла [207]. За счет подавления активации VEGF-A зависимого сигнального пути снижается активность таких важнейших внутриклеточных молекул, как FAK, Src, MEK, ERK, Akt, p70S6K [208].

В другом исследовании остол, колумбианадин и колумбианетина ацетат, выделенные из корней *Angelicae pubescentis*, обнаружили способность ингибировать продукцию и выделение фактора хемотаксиса моноцитов 1 типа (провоспалительный фактор), являющийся одним из важнейших регуляторов клеточной миграции [208]. Сесквитерпеновые кумарины, изолированные из *Ferula szwiziana* продемонстрировали антиангиогенный и цитотоксический эффект в отношении клеток человеческого колоректального рака (HT-29) за счет подавления синтеза ангиопоэтина 1 и 2 [209]. Другой природный кумарин дафнетин (7,8-гидроксикумарин) ингибирует экспрессию вовлеченных в ангиогенез сигнальных молекул MAPK, VEGFR2, ERK1/2, AKT, FAK и cSrc [210]. Муррангатин, выделенный из листьев *Micromelum falcatum*, ингибирует PI3K/AKT активность [211]. Ингибиторная активность в отношении MMP и VEGF обнаружена также у гальбановой кислоты [212], умбеллипренина [213], аураптена [214] и др. [215, 216].

### 1.3.2 Антибластомные свойства полусинтетических и синтетических кумаринов

Рассуждая об особенностях цитотоксического действия кумаринов следует обратить внимание на их относительную безопасность по сравнению с синтетическими антибластомными средствами [217, 218]. Применение методов фармацевтической химии позволило получить полусинтетические производные природных кумаринов, у которых в механизме действия снижаются прямые цитотоксические свойства при сохранении или усилении таргетного воздействия на внутриклеточные сигнальные системы, участвующие в опухолевой прогрессии при определенных типах злокачественных новообразований [219].

Недавно были синтезированы несколько сульфоновых производных кумаринов. На модели человеческой гепатоцеллюлярной карциномы соединения обнаружили способность снижать миграцию и метастазирование опухоли на фоне отсутствия прямого цитотоксического действия. Описанный эффект был обусловлен подавлением экспрессии MMP-2 [218].

Синтезированный кумарин из группы хроменов 2-оксо-2H-хромен-6-сульфонил продемонстрировал наиболее значимый антиангиогенный эффект из всех представителей группы вследствие подавления активности MMP-2 и ингибирования экспрессии CD105.

Помимо биологических экспериментов были предприняты и довольно успешные попытки прогнозирования активности моделируемых молекул на основе хроменов при помощи технологий молекулярного докинга. В этих работах из десятков соединений наибольшую потенциальную активность удалось зарегистрировать у соединения I52 с нитрогруппировками. Это вещество за счет стереохимического соответствия с ионами цинка в сайте связывания цинк-содержащих протеинкиназ обеспечивало наиболее селективную блокаду ферментов. При этом, у 2-оксо-2H-хромен-6-сульфонильного производного с

N-ацетилпиразолоновым заместителем в 6 положении был обнаружен оптимальный терапевтический противоопухолевый эффект с умеренным профилем безопасности [218].

Еще одна важная мишень, вовлеченная в экспрессию генов, участвующих в ангиогенезе, пролиферации и метастазировании, а также фармакорезистентности к противоопухолевым средствам, - NF-κB [219]. Ингибирование фактора рассматривается как один из наиболее эффективных путей сдерживания опухолевой прогрессии при многих онкологических процессах. В недавно проведенном исследовании был изучен противоопухолевый эффект 26 новых синтетических кумаринов на модели человеческой гепатоцеллюлярной карциномы в культуре клеток. Было установлено, что наиболее активным веществом является 7-карэтоксиамино-2-оксо-2H-хромен-4-ил метилпироллидин-1-карбодитиоат, которое в зависимости от экспозиции и созданной концентрации препятствовало связыванию NF-κB с ДНК и, тем самым, ингибировало экспрессию ряда генов, в частности циклина D1, Bcl-2, сурвивина, MMP-12 и c-Myc [219]. Кроме этого, соединение подавляло клеточную миграцию и инвазию, вызванную CXCL12, цитокином, рекрутирующим клетки предшественники гемопоэза из красного костного мозга.

Современные методы анализа в ряду структура – активность и структура – токсичность позволяют с высокой предиктивной точностью предсказывать активность тех или иных молекул в отношении определенных форм злокачественных процессов. Так, для производных с арил-карбоксамидным и фенильным заместителями в С-3 позиции, с 1,2,3-триазолильным, тригидроксильным и амино-заместителями в С-4 положении была спрогнозирована наибольшая активность в отношении рака легкого.

Предварительные *in vitro* результаты выявили антипролиферативный эффект таким образом спрогнозированных изоксазолиновых производных кумаринов в отношении клеток человеческой меланомы (UACC 903) и асцитной карциномы Эрлиха [220].

Одним из ключевых ферментов, контролирующих клеточную пролиферацию и дифференцировку, является гистонная диацетилаза-1. На основе прогнозирования активности было установлено, что подавляющим действием в отношении энзима, обладают бензамидные производные кумаринов, из которых 4 соединения N-(4-((2-аминофенил)карбомоил) бензил)-2-оксо-2H-хромен-3-карбоксамида – наиболее активны. Их цитотоксический эффект реализуется в микромолярных концентрациях в отношении клеточных линий HCT116, A2780, MCF7, PC-3, HL60 и A549 человеческих и животных опухолей без негативного воздействия на неизмененные человеческие клетки [221].

Еще одним интересным производным кумаринов является (E)-2-(40-метоксибензилокси)-3-пренил-4-метокси-N-гидроксицинамид (BMX) – полусинтетический дериват остола и кумарина, обнаруженный в ряде растений, таких как *Cnidium monnieri L*, *Angelica archangelica L*, *Angelica pubescence M* и др. Вещество подавляет пролиферацию клеток, миграцию и формирование эндотелиальных трубок, VEGF-индуцированное образование сосудистых микроветвей в культуре калоректального рака HCT116. Также соединение угнетало рост и пролиферацию HCT116 на ксенографтной модели опухоли [222].

Одним из богатых источников перспективных противоопухолевых средств являются производные скополетина. Сам алкалоид подавляет VEGF-A, ERK1 и FGF-2 [223]. В сравнительно недавно проведенном исследовании было установлено, что три производных скополетина – 4-бромифенильные и 4-хлорофенильные дериваты и 2-гидрокси-3-(пиперидин-1-ил)-пропокси)-6-метокси-2H-хромен-2-он ингибируют пролиферацию, миграцию и неоангиогенез в опухолевой ткани за счет снижения активации ERK1/2 and Akt [224, 225]. Luo с соавт. показали, что аналоги 3-арил-4-анилино/арилокси-2H-хромен-2-он значительно подавляли рост рака молочной железы посредством ингибирования альфа эстрогеновых рецепторов и VEGFR-2 [225]. В другом исследовании конъюгат кумарина с бензофеноном продемонстрировал активность в отношении асцитной карциномы Эрлиха и асцитной лимфомы Дальтона.

В более поздних работах Makowska и соавт. были опубликованы результаты изучения противоопухолевой активности серии 2-амино-2H-хромен-3-ил-1,3,5-триазиновых соединений. Среди них 4-[7-(диэтиламино)-2-имино-2H-хромен-3-ил]-6-(4-фенилпиперазин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-амин об-наруживал наивысшее цитотоксическое действие в отношении ряда линий человеческих злокачественных опухолей [226].

В нашей лаборатории было изучено полусинтетическое соединение кумарина 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4H-хромен-3-карбонитрила 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 [10-16].

Наряду со значительной антибластомной активностью коллективом авторов также была установлена высокая безопасность системного перорального применения соединения. В частности, коллеги определили, что производное хромена относится к малотоксичным соединениям, при курсовом введении не обладает алергизирующим, 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)-4H-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтанат безусловно привлекательным как потенциальный кандидат в лекарственное средство.

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

## **2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

По современным представлениям механизм противоопухолевого действия потенциально активного фармакологического вещества может объясняться воздействием на ведущие механизмы опухолевого роста и прогрессии: ингибированием роста и нарушением конденсации тубулина, индукцией апоптоза и аутофагии, подавлением миграции, инвазии и метастазирования. Кроме того, большое значение сейчас придается препаратам – блокаторам митоген-активируемых протеинкиназ, так называемым таргетным антибластомным агентам.

Исходя из накопленных к настоящему времени сведений о фармакологии противоопухолевых хроменов – природных или полусинтетических кумаринов – при планировании настоящего исследования и выборе методов изучения механизма действия 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаната мы приняли во внимание то, что вещества рассматриваемого класса практически лишены прямой цитотоксичности, но, вместе с тем, нарушают процессы роста и пролиферации малигнизированных клеток, инвазию и метастазирование.

### **2.1 Соответствие исследования требованиям гуманного обращения с животными и иным биоэтическим установлениям**

Протокол диссертационного исследования был рассмотрен и утвержден на заседании Локального этического комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (протокол № от ноября 2019 года).

Исследование выполняется согласно утвержденным стандартным операционным процедурам (СОП) и в соответствии с требованиями, отраженными в следующих документах:

1. Федеральный Закон № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (действующая редакция).
2. Федеральный Закон № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (действующая редакция).
3. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 224 от 19.07.2007 г. «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».
4. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».
5. ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Национальный стандарт Российской Федерации).
6. ГОСТ Р 56701-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств» (Национальный стандарт Российской Федерации).
7. ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Межгосударственный стандарт, соответствующий «Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits») от 01.07.2016 г.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Изд-во «Гриф и К», 2012. – 944 с.
9. Директива Совета ЕС от 24 ноября 1986 г. о сближении Законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ ЕЕС) [227].

## 2.2 Дизайн диссертационного исследования

Дизайн настоящего диссертационного исследования представлен на рис.

4.



**Рисунок 4.** Дизайн исследования

Большое практическое и фундаментальное значение имела разработка адекватной модели неоплазии, которая бы воспроизводила условия реальной клинической практики. Для этого на первом этапе работы мы разработали ксенографтную модель немелкоклеточного рака легкого, в которой в качестве носителя человеческой опухоли использовали гуманизированных иммунодефицитных мышей с трансплантированными человеческими лимфоцитами.

Животным – носителям опухолевой системы – в течение определенного времени внутрижелудочно вводили исследуемое вещество и референтные противоопухолевые препараты, оценивали динамику опухолевого процесса, метастазирования, а также в образцах опухоли определяли активность процессов программируемой гибели злокачественных клеток, экспрессию тубулина-

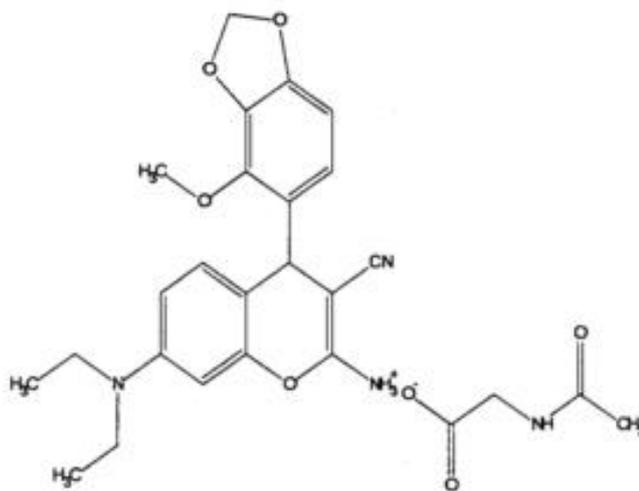
бета, фактора мезенхимальной трансформации и протеинкиназы анапластической лимфомы.

В опытах *in vitro* изучили влияние различных концентраций АХ-554 на процесс полимеризации тубулина, с помощью молекулярного докинга определили сайт связывания АХ-554 с тубулином-мономером.

На завершающем этапе работы разработали аналитическую методику определения действующего вещества в крови лабораторных животных, определили системную кинетику АХ-554 в крови крыс и кроликов при внутривенном введении, биодоступность вещества при его внутрижелудочном введении.

### 2.3 Характеристика исследуемого производного аминохромена и референтных противоопухолевых препаратов

Предметом исследования явилось соединение хромена 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтанойл (лабораторный шифр АХ-554, рис. 5), синтезированное в АО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна, Россия)<sup>1</sup> [227].



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

<sup>1</sup> Выражаем признательность руководству АО «ВНЦ БАВ» и лично проф. С.Я. Скачиловой за предоставленную субстанцию АХ-554

Технология синтеза соединения описана нами ранее [10] и включает следующие этапы: 1) получение 2-аминохромена путем нагревания до 80°C и последующего кипячения в течение 10-15 мин. смеси этанола, метокси-4,5-метилена-диоксибензальдегида, 3-диэтиламинофенола и триэтиламина. 2-аминохромен образуется при охлаждении, фильтрации, кристаллизации и последующей перекристаллизации; 2) получение 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбо-нитрила N-ацетил-аминоэтаноат путем гомогенизации полученного 2-аминохромена с N-ацетиламиноэтановой кислотой, нагревания и кипячения гомогената в присутствии этанола с последующим охлаждением, фильтрацией и кристаллизацией получившегося продукта химической реакции. Полученное в результате соединение представляет собой светло-желтый мелкокристаллический порошок с температурой плавления 144-146°C и ИК-спектром,  $\nu$  см<sup>-1</sup> 3360, 3390, 3490 (NH), 2205 (CN), 1620, 1640 (C=C), 1560, 1540 (NHCO).

При изучении механизма действия АХ-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 М.О. Дудиной [227]: МДД – 21,2 мг/кг, СТД – 137,6 мг/кг и ВТД – 384,0 мг/кг. В желудок АХ-554 вводили в 1% крахмальном клейстере в объеме 0,5 мл. При проведении исследований в *in vitro* модельных системах применяли АХ-544 в от диапазоне от 10<sup>-9</sup> до 10<sup>-4</sup> М, с учетом того, что средняя эффективная концентрация (IC<sub>50</sub>) составляет 2x10<sup>-7</sup> М. Раствор приготавливали *ex tempore* с использованием в качестве растворителя подогретого физиологического раствора 0,9% хлорида натрия.

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 в эффективных противоопухолевых дозах, пропорциональных дозе АХ-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).

#### **2.4 Животные, использованные для формирования модели ксенографта и при проведении фармакокинетических исследований**

В работе использованы 165 самок 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).

Иммунодефицитные животные на протяжении пребывания в виварии, при выполнении эксперимента пребывали в полимерных клетках, подключенных к системе индивидуальной вентиляции с соблюдением условий естественного освещения, влажности 55-60% и температурного режима (24-26°C). Кормление мышей осуществляли автоклавированным кормом ФГБУ «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», стерильной питьевой водой. Подстил из автоклавированной стружки древесины лиственных пород дерева меняли еженедельно.

Кролики содержались в стандартных условиях, соответствующих требованиям ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Кормление кроликов – комбикормом того же производителя. Животные потребляли водопроводную воду без ограничений в доступе.

## 2.5 Разработка ксенографтной гетеротопической модели немелкоклеточного рака легкого

Для формирования ксенографтной модели немелкоклеточного человеческого рака легкого использовали метод, описанный нами ранее [228]. Забор опухолевого материала для инокуляции животным осуществлялся интраоперационно в онкологической клинике ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). Перед интраоперационным забором ткани опухоли добровольное информированное согласие на использование образцов биологических тканей в научных целях было получено у всех пациентов, чья опухолевая ткань применялась для формирования ксенографтной модели немелкоклеточного рака легкого. В табл. 1 представлена характеристика пациентов, чей биологический материал использовали при формировании ксенографтов. Для целей исследования использовали образцы тканей первичных опухолей без клинических и инструментальных признаков метастазирования пациентов, не получавших химиотерапевтического воздействия в анамнезе.

**Таблица 1** – Характеристика пациентов – доноров опухолей легких, использованных для формирования ксенографта

Пол, возраст	Гистологический вариант	Метастазы	Ксенографт
Мужчина, 57	Аденокарцинома	нет	Не получен
Мужчина, 63	Низкодифференцированный рак	нет	Не получен
Женщина, 59	Аденокарцинома	нет	Получен

Каждый фрагмент опухоли делился на три части: первая – предназначенная для инокуляции – немедленно помещалась во флаконы «Эппендорф», содержащие модифицированную основную минимальную среду Дулбеко (Merch-SIGMA-Aldrich, Германия) без антибиотиков и бычьей сыворотки и хранилась при 4°C. Вторая часть замораживалась при температуре –86°C

для последующего иммуногистохимического исследования, третий фрагмент – фиксировали в 10% забуференном формалине для гистологического исследования. Для трансплантации использовали только немелкоклеточные формы рака легкого, экспрессирующие Bcl-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 мм<sup>3</sup>, и с помощью трансплантационной иглы 8-10 кусочков пересаживали подкожно в области наружной поверхности бедра задней конечности мыши (рис. 6). После увеличения размера опухоли в четыре раза по сравнению с исходно пересаженным объемом (по результатам измерений электронным штангенциркулем) 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 мыши внутрибрюшинно вводили приблизительно  $5 \times 10^7$  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 мм<sup>3</sup>. 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



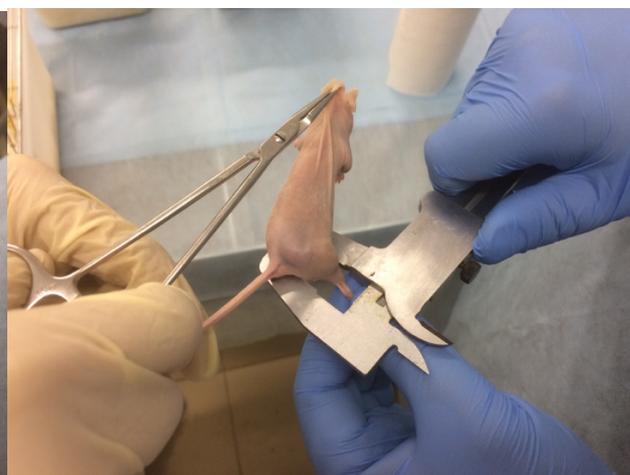
а



б



в



г



д



е

**Рисунок 6.** Этапы манипуляций в гуманизированными атимичными мышами BALB/c nu/nu: а) и б) – трансплантация опухолевых фрагментов; в) и г) – измерения подкожной опухоли штангенциркулем; д) и е) – внутрижелудочное введение веществ

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, используя известную формулу [229, 230]. Вычисляли индекс торможения роста опухоли (ТРО).

У всех животных осуществляли контроль болевого синдрома с использованием мимической шкалы оценки боли [231, 232]. Всем животным с умеренным болевым синдромом вводили внутривенно кетопрофен (K1751, Merck-SIGMA-Aldrich, Германия) в дозе 100 мг/кг внутривенно дважды в сутки [233]. Животных с тяжелым неконтролируемым болевым синдромом выводили из эксперимента под эфирным обезболиванием. Опухоли забирали для проведения иммуноферментного и ИГХ исследования. Внутренние органы извлекали и изучали на предмет обнаружения и подсчета количества метастазов.

## **2.6 Иммуноферментный метод исследования**

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

На первом этапе для приготовления тканевого гомогената 100 мг опухолевой ткани, после промывки забуференным физиологическим раствором гомогенизировали с таким же количеством фосфатного буфера и замораживали

до  $-20^{\circ}\text{C}$ . Трехкратное размораживание и замораживание приводило к разрушению цитоплазматических мембран и выходу клеточного содержимого в окружающее пространство. После центрифугирования образцов при 5000 об./мин. при температуре  $4-6^{\circ}\text{C}$  отбирали аликвоты, которые хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения количественного исследования.

## 2.7 Иммуногистохимическое исследование

Антиапоптотическую активность АХ-554 изучали по уровню экспрессии регуляторов апоптоза – каспазы-3 и Bcl-2 в ткани немелкоклеточного рака легкого, извлеченного у животных, получавших курсовую терапию соединением хрома методом иммуногистохимии (ИГХ). Опухолевый узел у животных извлекали, фиксировали в 4% растворе забуференного формалина в течение ночи при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ , затем, с целью криопротекции выдерживали в 30% растворе сахарозы в физиологическом 0,9% растворе хлорида натрия. Готовили срезы 30 нм в корональной проекции на криостате-микротоме (Leica SM 2000 R; “Leica”, Германия). Применяли авидин-биотиновый пероксидазный метод. После промывания срезов в физиологическом 0,9% растворе хлорида натрия, их помещали на 10 мин при комнатной температуре в ванночки в 0,3% раствором перекиси водорода в физиологическом 0,9% растворе хлорида натрия для инактивации эндогенных пероксидаз.

После промывания в физиологическом 0,9% растворе хлорида натрия срезы инкубировали в специальном растворе (10% нормальная козья сыворотка (ab138579 Abcam, Cambridge, Великобритания), 0,3% тритон X в физиологическом 0,9% растворе хлорида натрия) на 30 мин при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . После этого срезы обрабатывали первичными антителами к каспазе-3 (Rabbit Polyclonal Anti-Caspase 3 (разведение 1:100) клон ES87, “Genetex”, Германия) и Bcl-2 (Rabbit Polyclonal IgG Bcl-2 Antibody (C21), “Santa Cruz”, США) на 1 час при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  с последующей инкубацией в течение ночи при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . После промывания срезы инкубировали в goat anti-rabbit IgG (1:200; Abcam, Cambridge, Великобритания) в течение 1 часа при температуре

37°C. Цветная реакция проводилась в присутствии 0,05% диаминобензидина тетрахлорида и 0,03% перекиси водорода в физиологическом 0,9% растворе хлорида натрия при pH 7,4. Оценка проводилась по известной шкале с использованием светового микроскопа «OLYMPUS» (Япония).

## **2.8 *In vitro* метод изучения влияния АХ-554 на полимеризацию тубулина**

Влияние 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбо-нитрила N-ацетил-аминоэтаната на полимеризацию тубулина изучили при его инкубации в IC<sub>50</sub> 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, pH 6,9, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ хлорида магния, 1 мМ ГТФ и 5% глицерол) при 0°C, затем смесь помещалась в предподогретые до 37°C лунки 96-ячеечного планшета, содержащие исследуемое вещество и референтный препарат. 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.

## **2.9 Аналитический метод определения АХ-554 в крови и легких животных**

Для ответа на вопрос о накоплении исследуемого вещества в легочной ткани провели фармакокинетическое исследование. При исследовании фармакокинетики у кроликов породы «Советская шиншилла» (не менее, чем по 5 голов в группе) АХ-554 вводили внутривенно однократно через желудочный зонд в среднетерапевтической дозе, рассчитанной, на основании значений показателя ЛД<sub>50</sub>, определенного на крысах при исследуемом пути введения с учетом биологического переноса дозы, а также исходя из результатов исследования специфической фармакологической активности, диспергированной в 1% крахмальном клейстере объемом 1,0 мл, допустимом [15] для данного вида животных [15].

Извлечение АХ-554 из плазмы проводили путем жидкостно-жидкостной экстракцией этилацетатом с последующим упариванием органических вытяжек в вакууме досуха и последующей реэкстракцией 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.

Подготовка плазмы крови осуществлялась методом жидкостно-жидкостной экстракцией АХ-554 и IS этилацетатом. В пробирку Эппендорфа 4 мл отбирали 500 мкл плазмы, последовательно добавляли 5 мкл раствора IS (100,0 мкг/мл), 50 мкл 0.1 М раствора гидроксида натрия 3 мл этилацетата. Смесь перемешивали на аппарате для встряхивания жидкости 10 мин, затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. В чистую пробирку на 4 мл отбирали 2,4 мл органического слоя и упаривали в испарителе-концентраторе в течение 30 мин при температуре 40°C.

Сухой остаток после экстракции АХ-554 и IS экстрагировали 150 мкл подвижной фазы, центрифугировали при 13000 об/мин в течение 2 мин и вводили в хроматографическую систему. Для хроматографического разделения использовали колонку Intersil CN-3 (150×4,6 мм, 5 мкм). Режим работы насоса: изократический, скорость потока 1 мл/мин. Общее время анализа – 7,5 мин. Режим регистрации масс-спектров: ионизация ESI (детекция по катиону), температура источника 350 °С, газ-небулайзер – азот, поток газа 50 л/мин, ионизирующее напряжение 3 кВ, напряжение на линзе префильтра 75 В, сканирование по выбранным ионам со скоростью 2 скан/с. Объем вводимой пробы – 50 мкл.

## **2.10 Статистические методы анализа полученных результатов**

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 Каплана-Мейера.

В расчетной части применяли программные пакеты SPSS (IBM Inc., США) и BioStat, персональный компьютер iMac (Apple, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3. МЕХАНИЗМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ АХ-554 В ОТНОШЕНИИ КСЕНОГРАФТНОГО НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

На первом этапе исследования оценили терапевтическую эффективность соединения АХ-554 в опытах на животных – носителях ксенографтной человеческой опухоли легкого – немелкоклеточного рака в сравнении с референтными противобластомными средствами – доксорубицином и цисплатином.

#### 3.1 Результаты исследования противоопухолевой и антиметастатической активности АХ-554 на модели гетеротопического ксенографта рака легкого

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 при внутрижелудочном введении вещества мышам – носителям опухоли в течение семи суток в эффективных терапевтических дозах, определенных ранее в нашей лаборатории совместно с М.О. Дудиной [11, 247].

В группе контрольных BALB/c nu/nu мышей-самок гетеротопическая размер опухолевого узла через один день после окончания ложно-терапевтического курса с применением сопоставимых объемов 0,9% раствора хлорида натрия был равен  $1209 \pm 95 \text{ мм}^3$ , через неделю –  $7724 \pm 356 \text{ мм}^3$ , а через 21 день наблюдения –  $8468 \pm 579 \text{ мм}^3$ . Масса извлеченного опухолевого узла, экстирпированного на 22 день наблюдения достигала в среднем 9,9 г. На всем протяжении наблюдения наблюдали програссирование роста опухоли (таблица 2).

Референтный противоопухолевый антибиотик доксорубицин изучен в трех дозах. Во всех дозах препарат подавлял рост ксенографта рака легкого человека более, чем на половину по истечению недельного периода наблюдения и, следовательно, оказывал значимый противоопухолевый эффект на исследуемой *in vivo* платформе. При этом необходимо отметить особенность реализации действия препарата сравнения, заключающуюся в снижении эффекта доксорубицина ко второй неделе после прекращения его введения препарата.

**Таблица 2.** Значения индекса ТРО для АХ-554 и референтных лекарственных средств при внутрижелудочном введении атимичным гуманизированным мышам nu/nu BALB/c с подкожным ксенографтом рака легкого (1, 7 и 14 сутки после отмены экспериментальной терапии)

№ п/п	Группа	Доза, мг/кг/сут	ТРО, %		
			1 сут	7 сут	14 сут
1	Контроль	-	0	0	0
		60,2	32	60	41
2	Доксорубицин	113,3	45	66	58
		166,4	59	71	64
		4,5	49	49	51
3	Цисплатин	5,3	65	72	75
		6,0	92	97	97
		21,2	21	34	42
4	АХ-554	137,6	47	53	64
		384,0	70	71	75

Примечание: Данные по контролю, доксорубицину и цисплатину получены совместно с к.м.н. М.О. Дудиной [227]

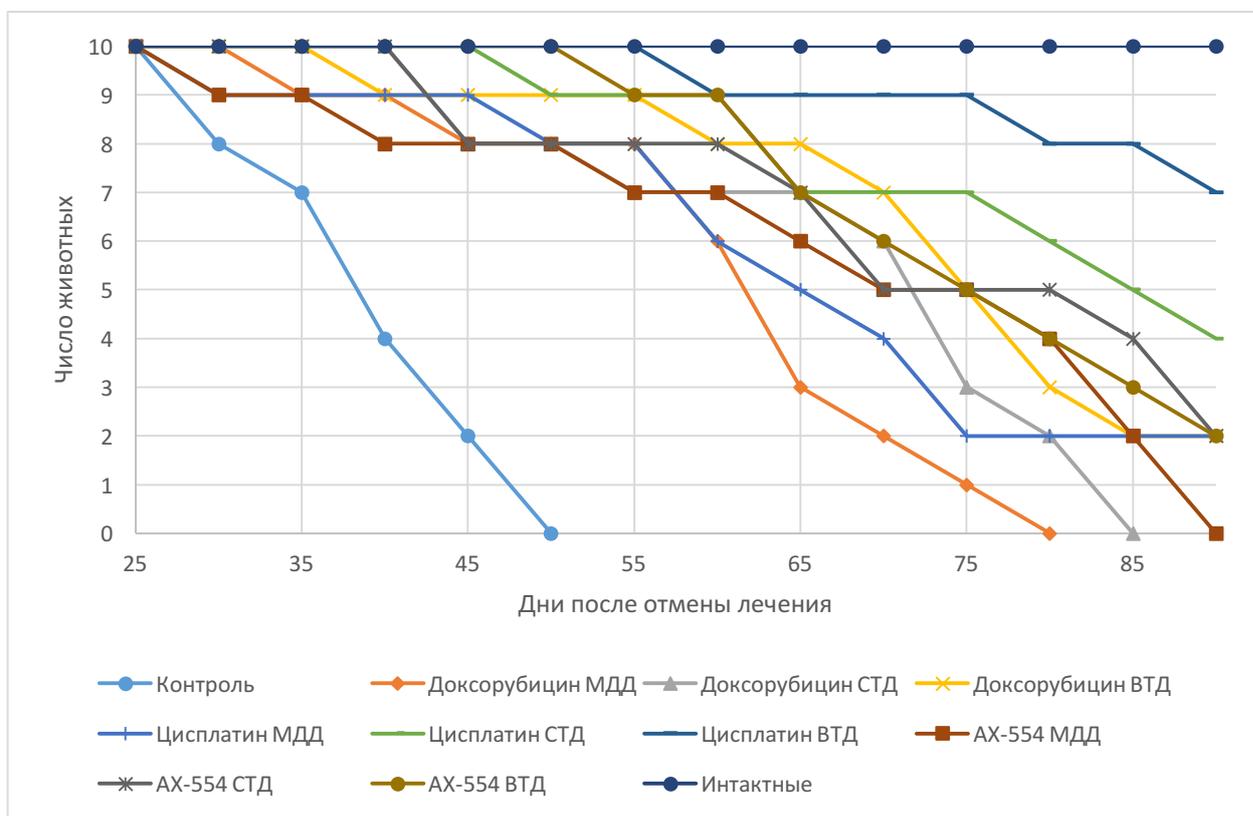
В качестве второго референтного противоопухолевого препарата мы выбрали средство из группы платиноидов цисплатин, широко назначаемый

при неоплазиях легкого. Особенностью фармакологического эффекта этого препарата на рассматриваемой модели было накопительное действие, проявлявшееся в сохранении темпов редукции опухоли (оцениваемых по значению индекса ТРО) на всем протяжении наблюдения после отмены референтного средства. Формирующийся при этом мощный антиметастатический эффект позволил на 80% сократить частоту метастазирования в исследуемой группе животных.

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) сопровождалась 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 (21 сутки после окончания курсового введения) регистрировали сокращение размеров гетеротопического опухолевого узла (таблица 2), что подтверждает наличие той же особенности реализации действия соединения, что и в случае с цисплатином. Также в исследуемых группах отмечали статистически значимое уменьшение интенсивности метастазирования, достигавшее наименьших значений в группе мышей, получавших СТД и ВТД АХ-554.

Помимо динамики величины и массы опухолевого узла важнейшим показателем терапевтической эффективности противоопухолевого средства является увеличение выживаемости, которую изучали на 10 случайным образом выбранных мышах до 90 суток или до момента гибели (что наступало ранее) (рисунок 7). Все исследуемые препараты сравнения увеличивали продолжительность жизни экспериментальных иммунодефицитных гуманизированных

мышей с ксенографтом опухоли легкого человека. При этом наибольшая средняя продолжительность жизни отмечена в группе животных, получавших СТД и ВТД цисплатина [227] – в обоих случаях она была рассчитана прогностически – 91 и 167 дней, поскольку препарат вызывал выздоровление 40% и ремиссию у 30% животных в ВТД и ремиссию в 40% животных при введении в СТД.

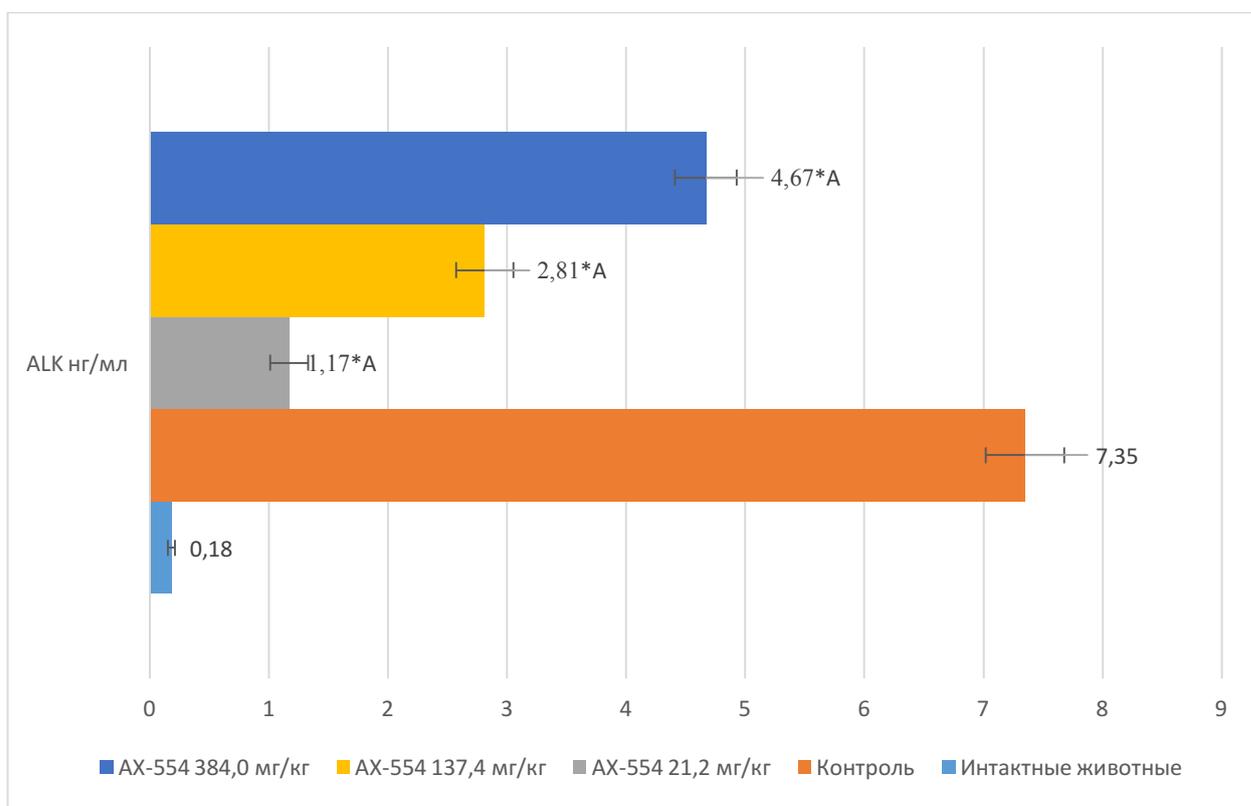


**Рисунок 7.** Кривая выживаемости животных через 21 день после отмены специфической противоопухолевой терапии (Данные по контролю, доксорубицину и цисплатину получены совместно с к.м.н. М.О. Дудиной [227])

Вещество AX-554 также увеличивало опухолеспецифическую выживаемость животных, причем в группе СТД AX-554 показатель выживаемости составил 73 суток, а у животных, получавших в течение 7 суток внутрижелудочно ВТД AX-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 [227] AX-554 в СТД и ВТД, частота ремиссии составила 20%.

### 3.2 Результаты исследования влияния АХ-554 на тканевую экспрессию рецепторной тирозинкиназы (ALK) в опухоли

Изучили влияние курсового 7-суточного введения на тканевую экспрессию рецепторной тирозинкиназы анапластической лимфомы в ткани ксенографтной карциномы легкого у атимичных гуманизированных мышей-самок (рисунок 8). 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-амино-этанол изучен в трех терапевтических дозах – ВТД, СТД, МДД. Концентрация биомишени в ткани исследована на 21 сутки после трансплантации опухолевых фрагментов.



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

**Рисунок 8.** Уровни ALK в гомогенате опухолевой ткани на фоне 7-суточного введения АХ-554 в терапевтических дозах

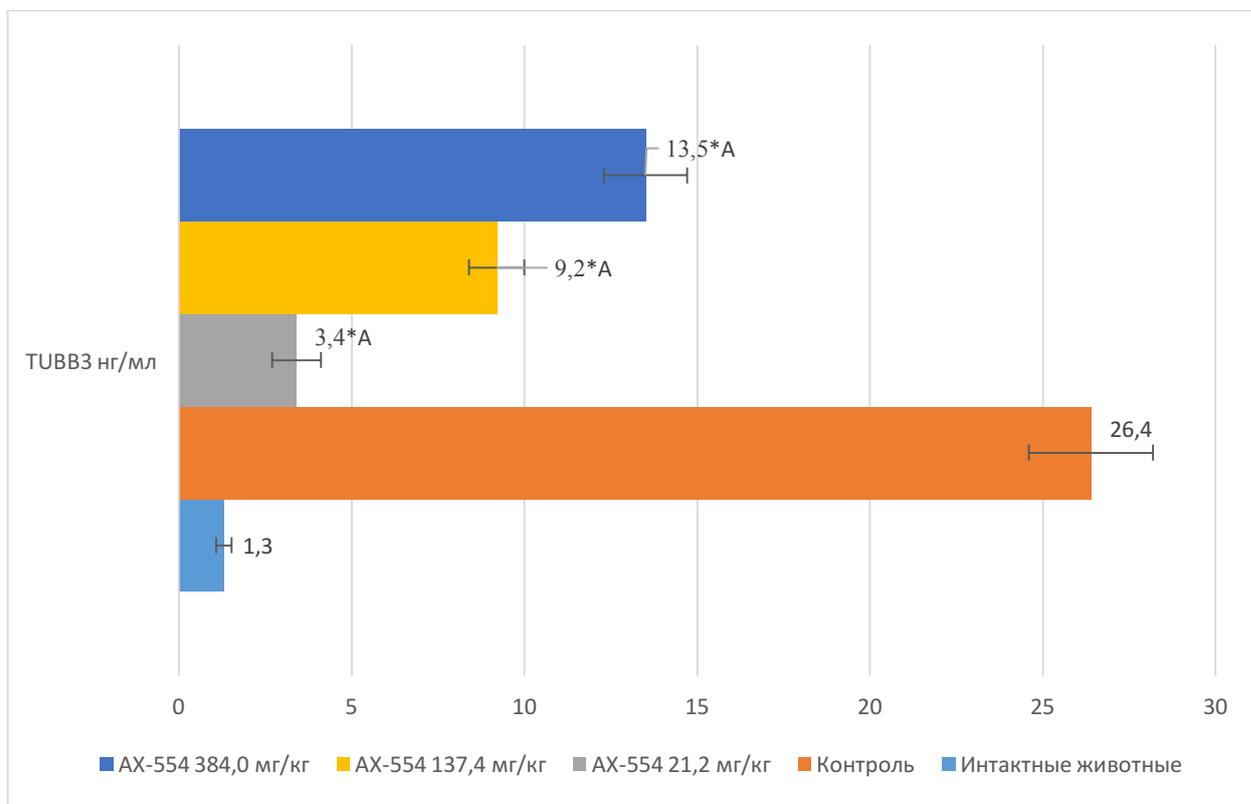
У животных контрольной серии уровень фермента повышался при сравнении с легкими интактных животных более, чем в 40 раз. Внутривентрикулярное введение вещества АХ-554 оказывало дозозависимый эффект, направленный на снижение уровня биологической мишени в опухолевой ткани: при введении в МДД концентрация АLK в опухоли равнялась в среднем 4,67 нг/мл, при введении в STD – 2,81, а при введении в ВТД – 1,17 нг/мл, что приближалось к значениям, полученным у интактных животных.

Известно, что ведущими белковыми структурами, участвующими в аутофагии, являются рапамициновый комплекс 1 (mTORC1), фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), киназа анапластической лимфомы (ALK) и некоторые другие [156]. PI3K/AKT путь является таргетом mTOR киназы: когда PI3K/AKT активированы, аутофагия ингибируется активной mTOR. И наоборот, подавление активности PI3K/AKT сигнального пути ведет к активации аутофагии. Аутофагия, эволюционно законсервированный катаболический процесс, есть не что иное, как деградация клетки для очистки от поврежденных поверхностных протеинов и органелл. Часто аутофагия активируется реактивными формами кислорода, гипоксией, недостатком питательных веществ, лекарственными стимулами или повреждением эндоплазматического ретикулума. Полученные результаты свидетельствуют о том, что АХ-554 приводит к активации аутофагии опухолевых клеток, что может рассматриваться как один из механизмов действия соединения.

### **3.3 Результаты определения тканевой концентрации тубулина бета III в опухоли на фоне курсового введения АХ-554**

Изучили влияние курсового 7-суточного введения на тканевую концентрацию структурного онкогена – тубулина бета подкласса 3 в ткани немелкоклеточного ксенографтного рака легкого (рисунок 9). 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбо-нитрила N-ацетил-аминоэтаноат изучен в трех терапевтических дозах – ВТД,

СТД, МДД. Концентрация биологической мишени в ткани исследована на 21 сутки после трансплантации опухолевых клеток.



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

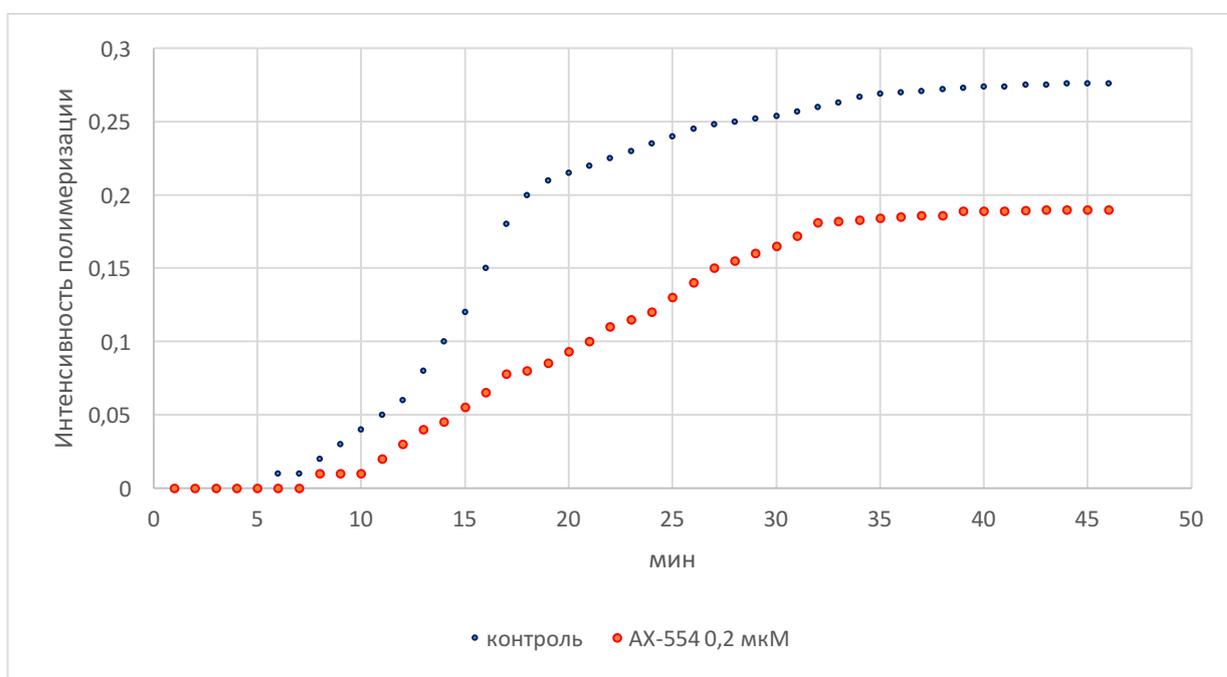
**Рисунок 9.** Содержание TUBB3 в гомогенате опухолевой ткани ксенографтного рака легкого на фоне 7-суточного введения AX-554 в терапевтических дозах

У животных контрольной серии уровень структурного онкогена повышался при сравнении с легкими интактных животных более, чем в 20 раз. Внутривенное введение AX-554 оказывало дозозависимый эффект, направленный на снижение уровня биологической мишени 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, что приближалось к значениям, полученным у интактных животных. Полученные результаты говорят о способности 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбо-нитрила N-ацетил-аминоэтан-оата подавлять процесс деления опухолевых клеток в силу блокирования образования микротрубочек, необходимых для расхождения ДНК.

### 3.4 Влияние АХ-554 в диапазоне концентраций на полимеризацию тубулина в опытах *in vitro*

В специально созданной модельной системе изучили влияние различных концентраций АХ-554 на процесс полимеризации тубулина головного мозга быка. 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-амино-этан-оат исследовали в концентрации  $2 \times 10^{-7}$  М, которая соответствовала  $IC_{50}$ , установленной на клеточной культуре человеческой аденокарциномы легкого А547/АТСС [15]. На рисунке 10 представлены результаты проведенных экспериментов.



**Рисунок 10.** Динамика полимеризации тубулина в *in vitro* модельной системе

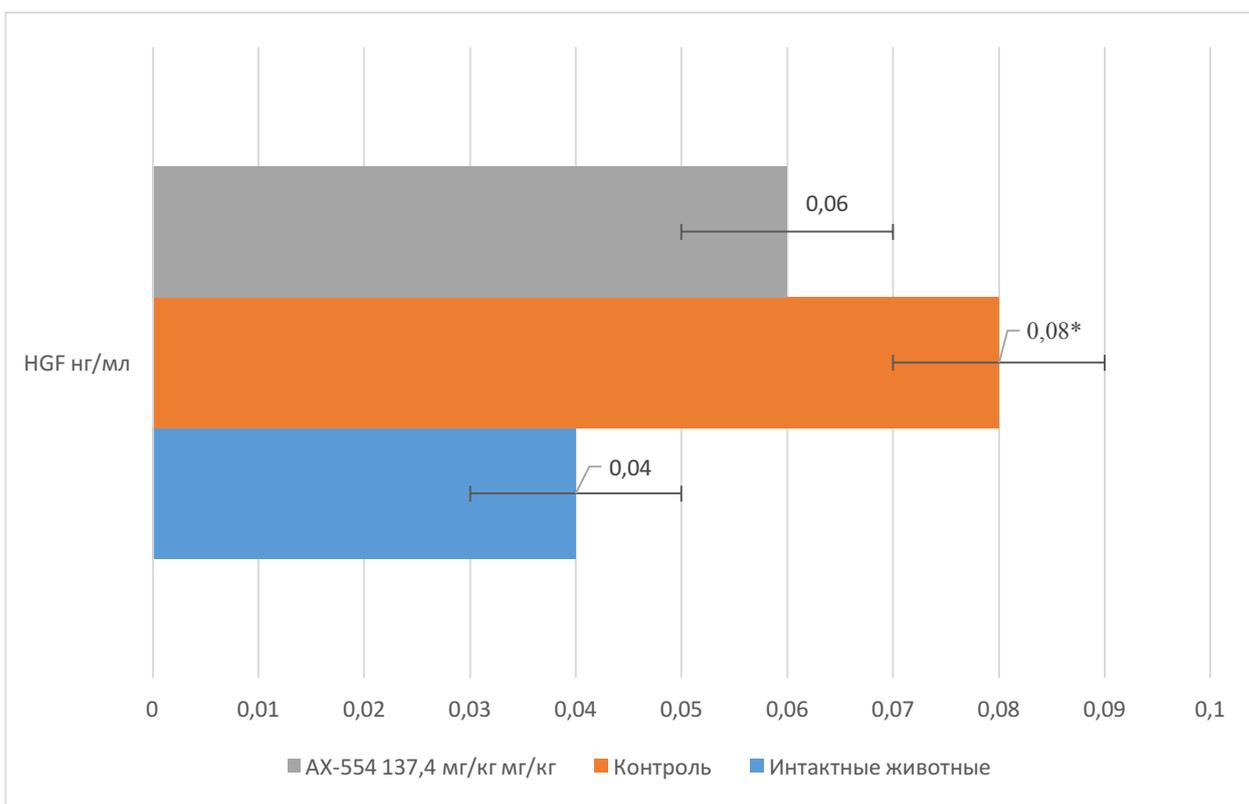
При инкубации мономерного тубулина головного мозга быка с 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноатом в концентрации  $2 \times 10^{-7}$  М наблюдали отставание начала процесса полимеризации в среднем на 4 мин по сравнению с контрольными опытами. Интенсивность полимеризации тубулина на всем протяжении наблюдения была снижена и к концу опыта составила 68,8% от контрольных значений.

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.

### **3.5 Результаты исследования экспрессии с-MET в ткани опухоли под действием АХ-554**

Изучили влияние курсового 7-суточного введения на тканевое содержание с-MET (мезенхимально-эпителиальный фактор трансформации) в ткани ксенографтной опухоли легкого (рисунок 11) по уровню продукта его активации – HGF. 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноат изучен в средней терапевтической дозе. Концентрация биологического маркера в опухолевой ткани исследована на 21 сутки после трансплантации опухолевых клеток.

У животных контрольной серии уровень онкогена повышался при сравнении с легкими интактных животных, в 2 раза. Внутрижелудочное введение АХ-554 в средней терапевтической дозе оказывало снижающий эффект при этом статистических различий ни с контролем, ни с интактными животными получено не было.



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

**Рисунок 11.** Уровни HGF в гомогенате опухолевой ткани на фоне 7-суточного введения AX-554 в средне-терапевтической дозе

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

личий концентрации продукта активации с-MET в группе животных, получавших АХ-554 при их сравнении ни с интактными, ни с контрольными животными.

### **3.6 Исследование влияния АХ-554 на активность программируемой гибели клеток ксенографтной опухоли**

Как известно, апоптоз включает генетически запрограммированную элиминацию клеток [89] и представляет собой один из фундаментальных процессов развития, физиологии и гомеостаза. Любое нарушение в балансе про- и антиапоптотических механизмов может сопровождаться широким спектром нарушений, в том числе и малигнизацией. В организме млекопитающих в результате последних исследований идентифицированы две ведущих сигнальных системы, заканчивающихся активацией каспаз и запуском апоптоза. К ним относится внутренний путь активации, митохондриальной гибели [91], и внешний путь активации, или путь гибели рецепторов [92]. Оба пути сходятся на активации каспазы-3 и последующих дефрагментации ДНК, деградации цитоскелета и ядерных белков, перекрестном связывании протеинов, формировании апоптотических телец, выработки лигандов – активаторов фагоцитирующих клеток и поглощении фагоцитами. При этом, внутренний путь запускается внутриклеточным стрессом, накоплением реактивных форм кислорода, радиоактивным излучением, редукцией факторов роста, снижением продукции цитокинов и воздействием цитотоксических лекарственных средств. Этот процесс контролируется семейством Bcl-2 протеинов [94], которые приводят к выходу цитохрома с из митохондрий в цитозоль, генерации апоптосомы – молекулярной платформы для активации каспазы-9, которая в последующем активирует каспазы-3 и 7. Во внешний путь не вовлекаются митохондрии, он запускается через поверхностные клеточные рецепторы, такие как CD-95 (Apo-1, Fas), TRAIL, и рецепторы фактора некроза опухолей.

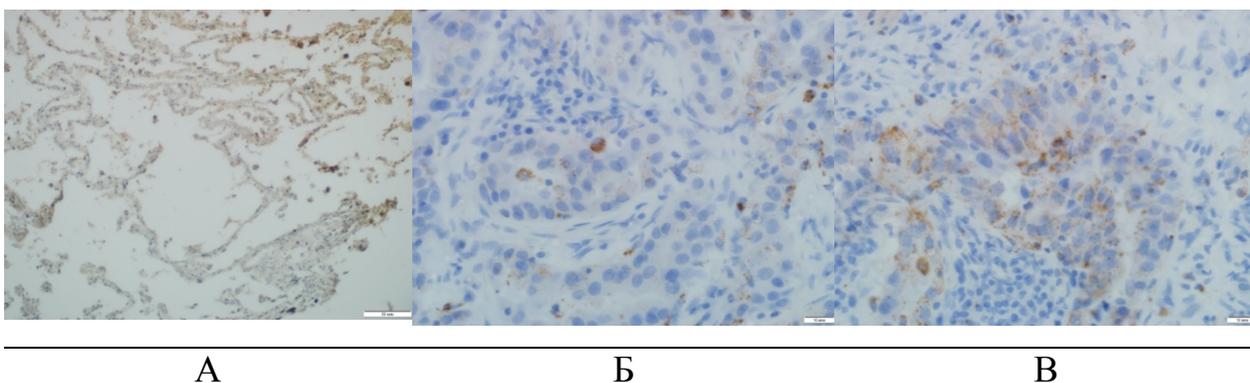
В этой связи активация апоптотического процесса в клетках опухоли может рассматриваться как ведущий механизм противоопухолевого действия кандидата в лекарственное средство.

Влияние 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаната на процессы программируемой гибели опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого изучили на ксенографтной модели при курсовом внутрижелудочном семисуточном введении соединения мышам-акцепторам опухоли в среднетерапевтической 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 АХ-554. Результаты представлены на рисунках 12 и 13 и в таблице 3.

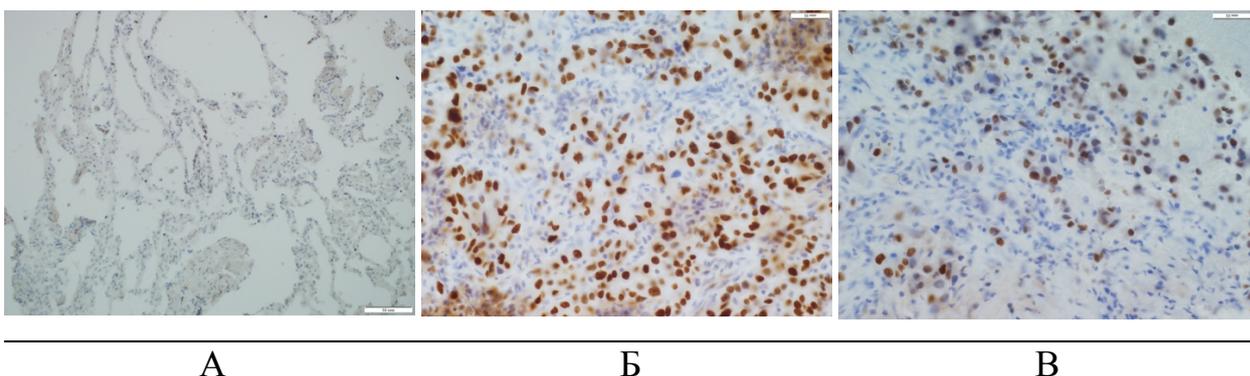
**Таблица 3.** Интенсивность положительной реакции клеток немелко-клеточного рака легкого при окрашивании антителами к каспазе 3 и Bcl-2 на фоне курсового введения АХ-554

№ 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.	Нелеченная опухоль (контроль)		59,4±3,2* p=0,001	3,8±1,2* p=0,001
3.	АХ-554 137,6 мг/кг/сут		12,6±1,5 <sup>a</sup> p=0,001	37,9±2,1 <sup>a</sup> p=0,001

*Примечание:* \* - различия при сравнении с интенсивностью окрашивания препаратов интактных легких статистически достоверны (ANOVA, критерий t Стьюдента); <sup>a</sup> – различия при сравнении с интактными легкими [15] и с препаратами животных, не получавших специфической терапии достоверны (ANOVA, критерий Тьюки)



**Рисунок 12.** Экспрессия каспазы-3 в препаратах интактных легких (А), немелкоклеточного ксенографтного рака легкого в отсутствии специфического лечения (Б), немелкоклеточного ксенографтного рака легкого на фоне курсового лечения АХ-554 (В), ИГХ, х500



**Рисунок 13.** Экспрессия Bcl-2 в препаратах интактных легких (А), немелкоклеточного ксенографтного рака легкого в отсутствии специфического лечения (Б), немелкоклеточного ксенографтного рака легкого на фоне курсового лечения АХ-554 (В), ИГХ, х500

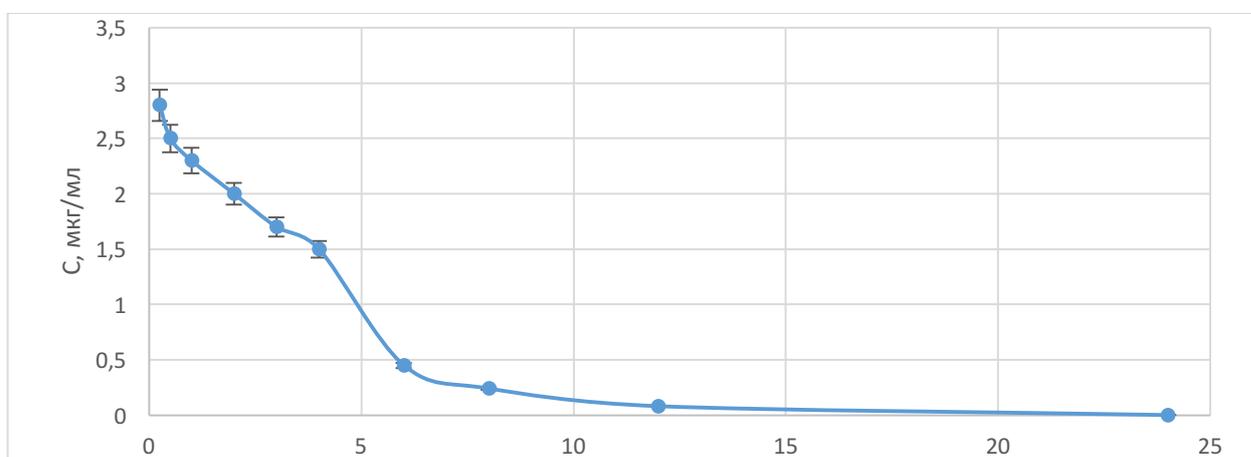
Интактные легкие мышей BALB/c nu/nu характеризуются низкой экспрессией маркера апоптотической активности каспазы-3 и умеренной экспрессией антиапоптотического Bcl-2, что отражает сбалансированное состояние клеточной популяции высокодифференцированных клеток. Малигнизированные клетки опухолевой ткани через 28 суток после трансплантации животным-акцепторам характеризуются подавлением апоптотической активности, что проявляется в негативном окрашивании клеток на каспазу-3 и высокой экспрессией Bcl-2.

Курсовое внутрижелудочное введение 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетиламиноэтаноата в средне-терапевтической дозе 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 AX-554.

## 4. СИСТЕМНАЯ КИНЕТИКА И БИОДОСТУПНОСТЬ АХ-554. ТКАНЕВАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ВЕЩЕСТВА В ЛЕГКИХ

### 4.1 Системная кинетика АХ-554 при внутривенном введении кроликам

Индивидуальные значения концентраций АХ-554 при его внутривенном введении кроликам в минимально-действующей дозе, соответствующей с учетом биологического переноса 5,8 мг/кг однократно, приведены в приложении А. Усредненная кривая концентрация-время для АХ-554 в дозе 5,8 мг/кг приведена на рисунке 14. Результаты расчета фармакокинетических параметров представлены в таблице 4.



**Рисунок 14.** Фармакокинетическая кривая АХ-554 при однократном внутривенном введении кроликам в дозе 5,8 мг/кг в линейных координатах

Полученные результаты свидетельствуют о корректности выбранного дизайна исследования: на конечной точке АХ-554 в плазме крови даже при введении в минимально-действующей дозе определялась у 6 из 6 животных, отношение  $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$  составило 98,4% (допустимое значение – более 80%). Уравнение зависимости концентрации АХ-554 от времени имело вид:

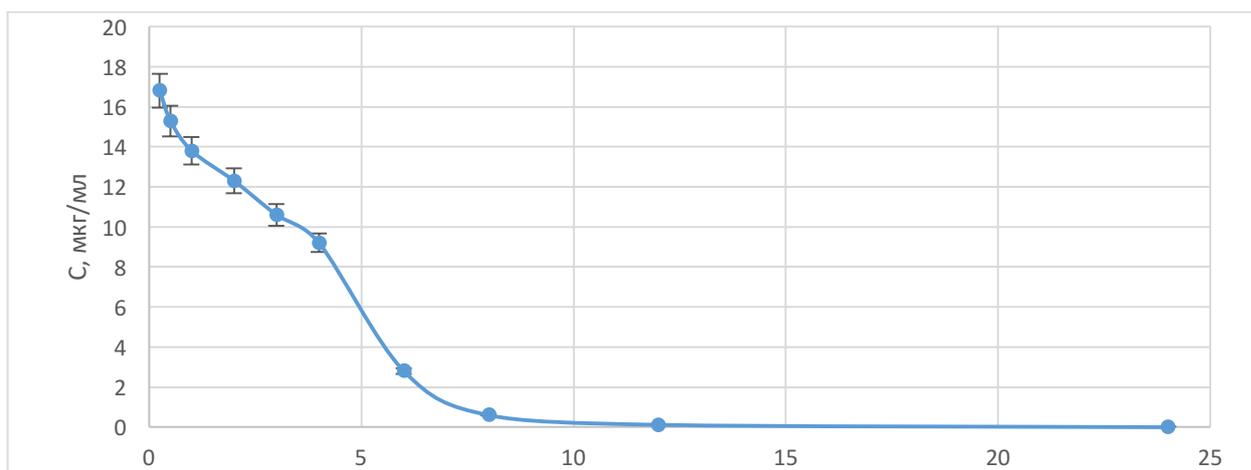
$$C=2,13 \times e^{-1,15t}+0,9 \times e^{-0,07t}$$

Измеренная максимальная концентрация АХ-554 в плазме была равна 2,51 мкг/мл,  $AUC_{0-t}$  – 24,11 мкг/мл/ч,  $AUC_{0-\infty}$  – 24,78 мкг/мл/ч. Период полувыведения составил 3,89 ч. Кажущийся объем распределения был равен 3,2 л/кг, общий клиренс – 2,7 л/кг/ч.

**Таблица 4.** Значения фармакокинетических показателей АХ-554 в плазме крови при внутривенном введении вещества кроликам в дозе 5,8 мг/кг

Индекс	Измерительная единица	Результат измерения
$C_{\max}$	мкг/мл	2,51
$AUC_{0-t}$	мкг×ч/мл	24,11
$AUC_{0-\infty}$	мкг×ч/мл	24,78
$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$	%	97,8
MRT	ч	6,2
Vss	л/кг	7,7
$k_{el}$	ч <sup>-1</sup>	0,29
$t_{1/2}$	ч	3,91
$T_{\max}$	ч	2,71
Cl	мл/кг/ч	2,7

Индивидуальные значения концентраций соединения АХ-554 при его внутривенном введении кроликам в средне-терапевтической дозе, соответствующей с учетом биологического переноса 37,4 мг/кг однократно, приведены в приложении А. Усредненная кривая концентрация – время для АХ-554 в дозе 37,4 мг/кг приведена на рисунке 15. Результаты расчета фармакокинетических параметров представлены в таблице 5.



**Рисунок 15.** Фармакокинетические кривые АХ-554 при однократном внутривенном введении кроликам в дозе 37,4 мг/кг в линейных координатах

Уравнение зависимости концентрации АХ-554 от времени имело вид:

$$C=13,7 \times e^{-1,17t}+1,28 \times e^{-0,09t}$$

Измеренная максимальная концентрация АХ-554 в плазме была равна 16,57 мкг/мл,  $AUC_{0-t}$ – 126,91 мкг/мл/ч,  $AUC_{0-\infty}$  - 128,14 мкг/мл/ч. Период полувыведения составил 3,02 ч. Кажущийся объем распределения был равен 4,3 л/кг, общий клиренс – 2,9 л/кг/ч.

**Таблица 5.** Значения фармакокинетических показателей АХ-554 в плазме крови при внутривенном введении кроликам в дозе 37,4 мг/кг

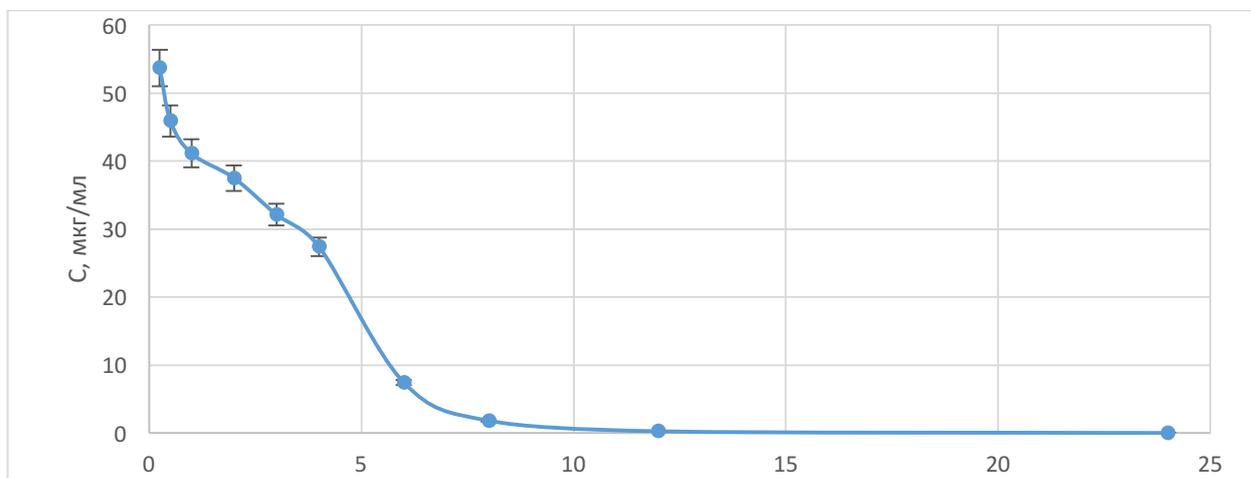
Индекс	Измерительная единица	Результат измерения
$C_{max}$	мкг/мл	16,57
$AUC_{0-t}$	мкг×ч/мл	126,91
$AUC_{0-\infty}$	мкг×ч/мл	128,14
$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$	%	99,2
MRT	ч	5,9
$V_{ss}$	л/кг	7,5
$k_{el}$	ч <sup>-1</sup>	0,29
$t_{1/2}$	ч	3,02
$T_{max}$	ч	3,32
Cl	мл/кг/ч	2,9

Индивидуальные значения концентраций соединения 4-аминохромена АХ-554 при его внутривенном введении кроликам в высшей терапевтической дозе, соответствующей с учетом биологического переноса 104,3 мг/кг однократно, приведены в приложении А. Усредненная кривая концентрация-время для АХ-554 в дозе 104,3 мг/кг приведена на рисунке 16. Результаты расчета фармакокинетических параметров представлены в приложении А, а их значения представлены в таблице 6.

Уравнение зависимости концентрации АХ-554 от времени имело вид:

$$C=46 \times e^{-1,12t}+3,92 \times e^{-0,08t}$$

Измеренная максимальная концентрация АХ-554 в плазме была равна 55,7 мкг/мл,  $AUC_{0-t}$  – 311,33 мкг/мл/ч,  $AUC_{0-\infty}$  - 313,48 мкг/мл/ч. Период полувыведения составил 3,01 ч. Кажущийся объем распределения был равен 3,9 л/кг, общий клиренс – 2,7 л/кг/ч.



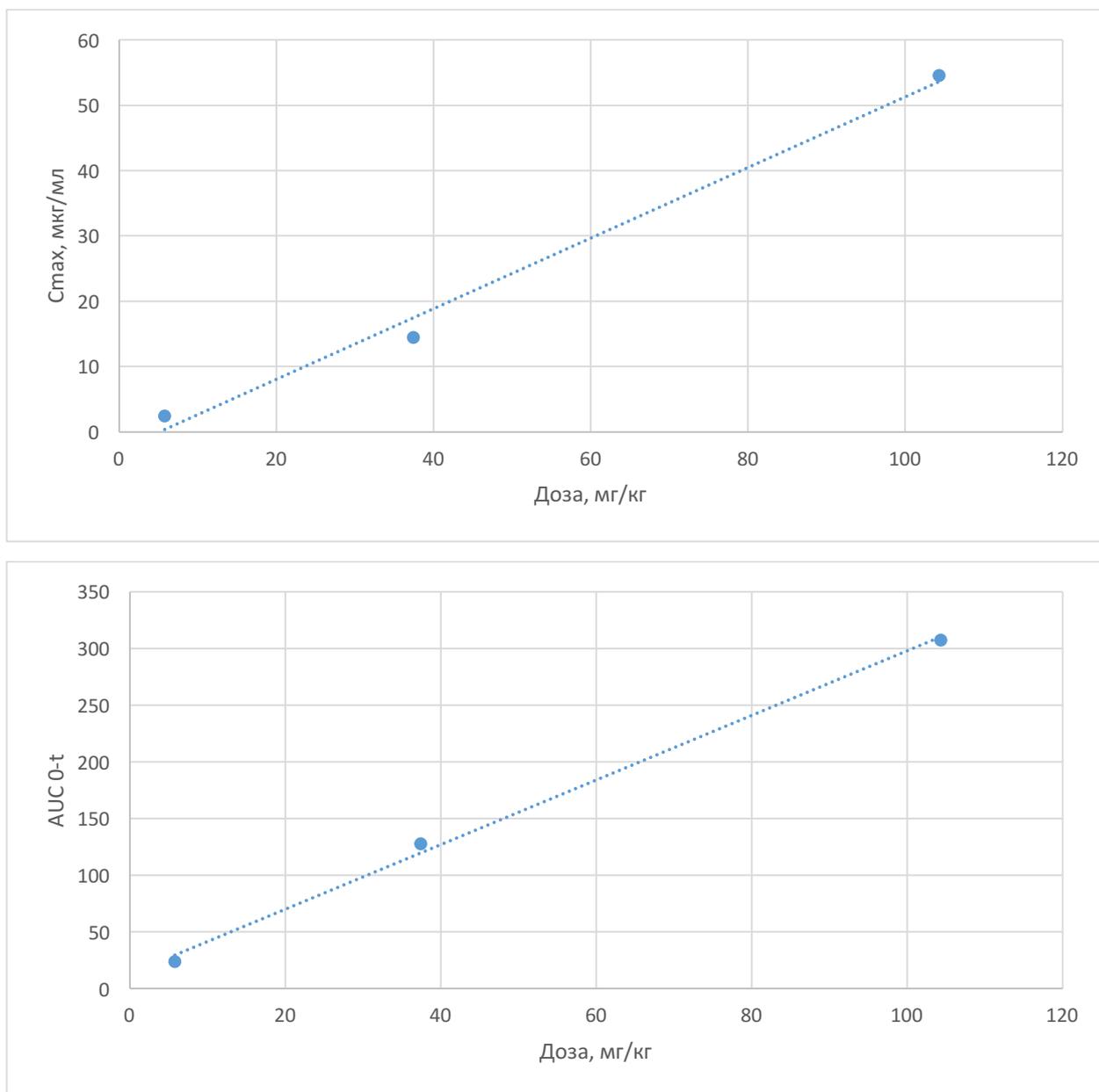
**Рисунок 16.** Фармакокинетические кривые АХ-554 при однократном внутривенном введении кроликам в дозе 104,3 мг/кг в линейных координатах

**Таблица 6.** Значения фармакокинетических показателей АХ-554 в плазме крови при внутривенном введении на ее основе кроликам в дозе 104,3 мг/кг

Индекс	Измерительная единица	Результат измерения
$C_{max}$	мкг/мл	55,7
$AUC_{0-t}$	мкг×ч/мл	311,33
$AUC_{0-\infty}$	мкг×ч/мл	313,48
$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$	%	99,1
MRT	ч	6,1
$V_{ss}$	л/кг	7,2
$k_{el}$	ч <sup>-1</sup>	-0,29
$t_{1/2}$	ч	4,32
$T_{max}$	ч	3,02
Cl	мл/кг/ч	2,7

Определение фармакокинетических параметров при внутривенном введении в трех терапевтических дозах необходимо для решения вопроса о линейности фармакокинетики потенциального лекарственного средства при его

системном введении. Гипотезу линейности определили для зависимости  $C_{\max}$  и  $AUC_{0-t}$  от вводимой дозы АХ-554. Результаты представлены на рисунке 17.



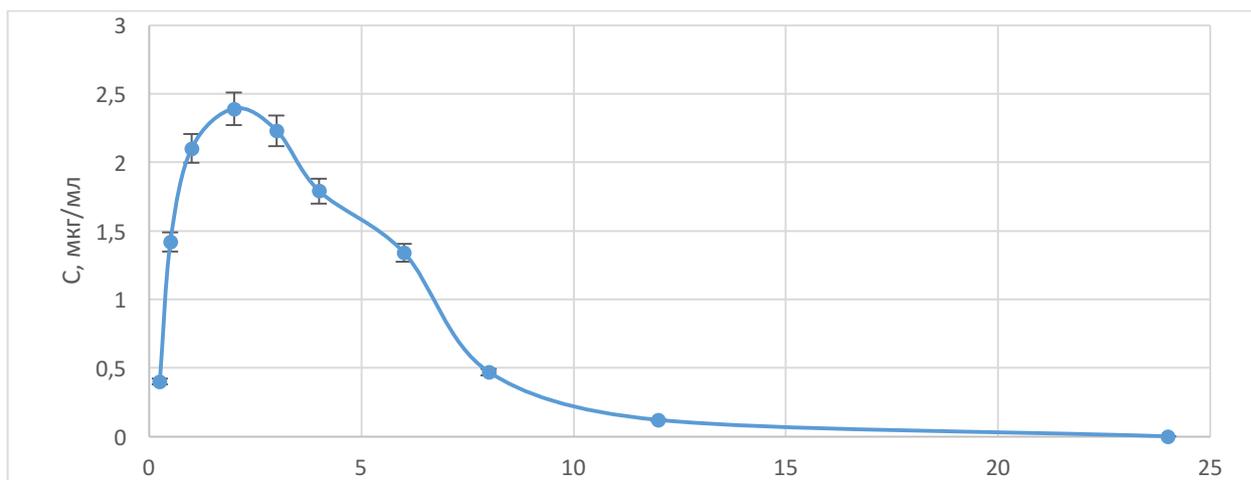
**Рисунок 17.** Линейность изменения максимальной измеренной концентрации и  $AUC_{0-t}$  АХ-554 в плазме крови кроликов при внутривенном введении в дозах 5,8; 37,4 и 104,3 мг/кг

Таким образом, при внутривенном введении кроликам доказана линейность изменения основных фармакокинетических параметров 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата.

## 4.2 Биодоступность и кинетика АХ-554 при внутрижелудочном введении кроликам

Поскольку преимущественным путем введения АХ-554 является путь введения внутрь, на следующем этапе нашего исследования изучили системную кинетику 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d] [1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаната при внутрижелудочном введении кроликам.

Индивидуальные значения концентраций АХ-554 при его внутрижелудочном введении кроликам в минимально-действующей дозе, соответствующей с учетом биологического переноса 5,8 мг/кг однократно, приведены в приложении А. Усредненная кривая концентрация-время для АХ-554 в дозе 5,8 мг/кг приведена на рисунке 18. Результаты расчета фармакокинетических параметров представлены в таблице 7.



**Рисунок 18.** Фармакокинетические кривые АХ-554 при однократном внутрижелудочном введении кроликам в дозе 5,8 мг/кг в линейных координатах

Полученные результаты свидетельствуют о корректности выбранного дизайна исследования: на конечной точке АХ-554 в плазме крови даже при введении в минимально-действующей дозе определялась у 6 из 6 животных, отношение  $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$  составило 98,4% (допустимое значение – более 80%).

Уравнение зависимости концентрации АХ-554 от времени имело вид:

$$C=2,25 \times e^{-1,15t}+0,76 \times e^{-0,07t}$$

Измеренная максимальная концентрация АХ-554 в плазме была равна 2,41 мкг/мл,  $AUC_{0-t}$  – 20,95 мкг/мл/ч,  $AUC_{0-\infty}$  – 21,88 мкг/мл/ч. Период полувыведения составил 4,77 ч. Кажущийся объем распределения был равен 3,3 л/кг, общий клиренс – 3,0 л/кг/ч. Абсолютная биодоступность составила 97,5%.

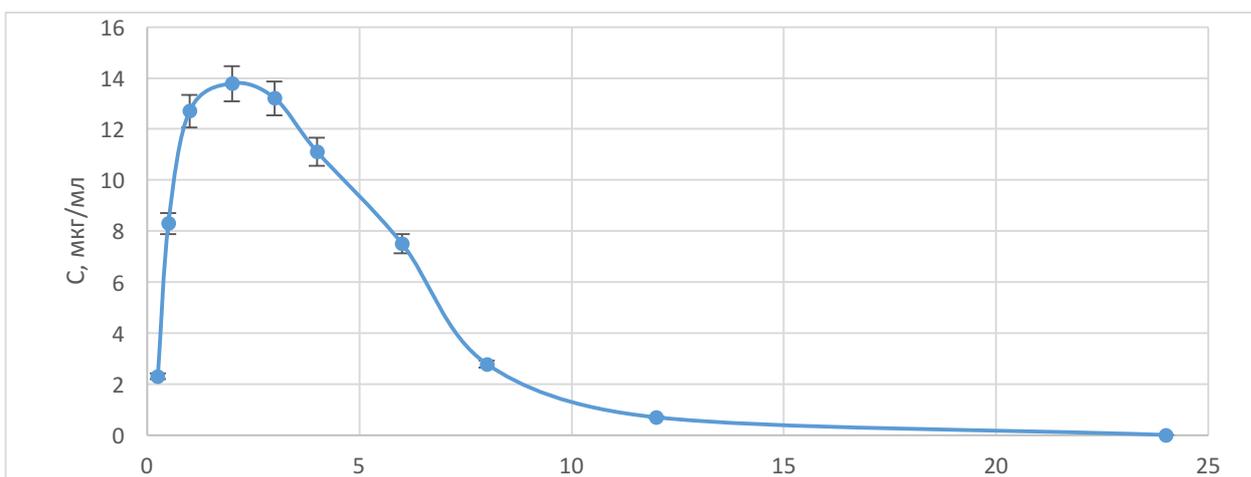
**Таблица 7.** Значения фармакокинетических показателей АХ-554 в плазме крови при внутрижелудочном введении кроликам в дозе 5,8 мг/кг

Индекс	Измерительная единица	Результат измерения
$C_{max}$	мкг/мл	2,41
$AUC_{0-t}$	мкг×ч/мл	20,95
$AUC_{0-\infty}$	мкг×ч/мл	21,88
$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$	%	98,7
MRT	ч	6,3
$V_{ss}$	л/кг	7,1
$k_{el}$	ч <sup>-1</sup>	0,30
$t_{1/2}$	ч	4,77
$T_{max}$	ч	2,32
Cl	мл/кг/ч	3,0

Индивидуальные значения концентраций АХ-554 при его внутрижелудочном введении кроликам в средне-терапевтической дозе, соответствующей с учетом биологического переноса 37,4 мг/кг однократно, приведены в приложении А. Усредненная кривая концентрация-время для АХ-554 в дозе 37,4 мг/кг приведена на рисунке 19. Результаты расчета фармакокинетических параметров представлены в таблице 8.

Уравнение зависимости концентрации АХ-554 от времени имело вид:

$$C=11,7 \times e^{-1,15t}+2,8 \times e^{-0,12t}$$



**Рисунок 19.** Фармакокинетические кривые АХ-554 при однократном внутривентриальном введении кроликам в дозе 37,4 мг/кг в линейных координатах

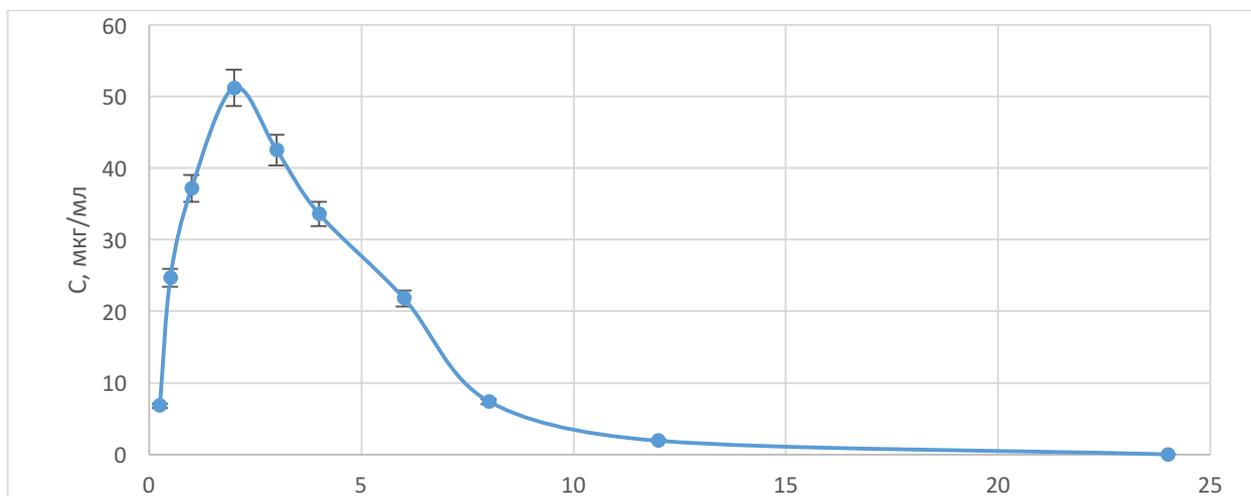
Измеренная максимальная концентрация АХ-554 в плазме была равна 13,87 мкг/мл,  $AUC_{0-t}$  – 119,03 мкг/мл/ч,  $AUC_{0-\infty}$  - 119,96 мкг/мл/ч. Период полувыведения составил 5,21 ч. Кажущийся объем распределения был равен 4,0 л/кг, общий клиренс – 3,2 л/кг/ч. Общая биодоступность составила 91,6%.

**Таблица 8.** Значения фармакокинетических показателей АХ-554 в плазме крови при внутривентриальном введении кроликам в дозе 37,4 мг/кг

Индекс	Измерительная единица	Результат измерения
$C_{max}$	мкг/мл	13,87
$AUC_{0-t}$	мкг×ч/мл	119,03
$AUC_{0-\infty}$	мкг×ч/мл	119,96
$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$	%	98,6
MRT	ч	6,0
Vss	л/кг	7,2
$k_{el}$	ч <sup>-1</sup>	0,28
$t_{1/2}$	ч	5,21
$T_{max}$	ч	2,84
Cl	мл/кг/ч	3,2

Индивидуальные значения концентраций АХ-554 при его внутривентриальном введении кроликам в высшей терапевтической дозе, соответствующей

с учетом биологического переноса 104,3 мг/кг однократно, приведены в приложении А. Усредненная кривая концентрация – время для АХ-554 в дозе 104,3 мг/кг приведена на рисунке 20. Результаты расчета фармакокинетических параметров представлены в таблице 9.



**Рисунок 20.** Фармакокинетические кривые АХ-554 при однократном внутрижелудочном введении кроликам в дозе 104,3 мг/кг в линейных координатах

Уравнение зависимости концентрации АХ-554 от времени имело вид:

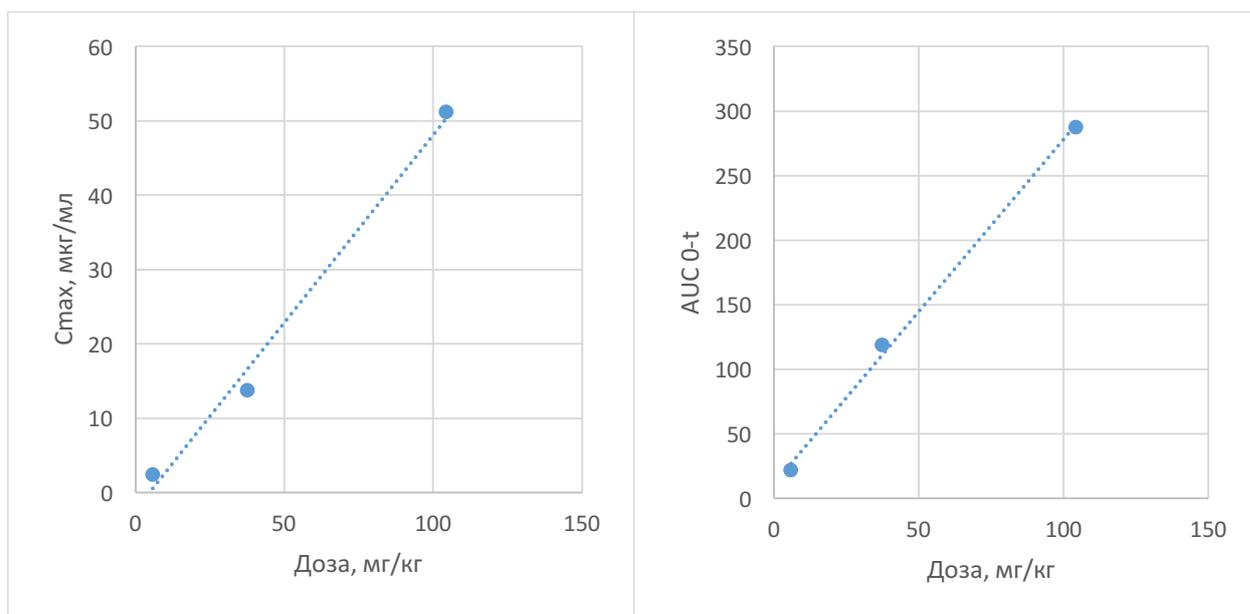
$$C=46*e^{-1,13 t}+3,2* e^{-0,09 t}$$

Измеренная максимальная концентрация АХ-554 в плазме была равна 51,2 мкг/мл,  $AUC_{0-t} = 287,53$  мкг/мл/ч,  $AUC_{0-\infty} = 285,43$  мкг/мл/ч. Период полувыведения составил 5,42 ч. Кажущийся объем распределения был равен 4,2 л/кг, общий клиренс – 2,8 л/кг/ч. Абсолютная биодоступность при введении в высшей терапевтической дозе составила 90,7%.

Определение фармакокинетических параметров 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диок-сол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата при внутрижелудочном введении в трех терапевтических дозах необходимо для решения вопроса о линейности фармакокинетики вещества при его внутрижелудочном введении. Гипотезу линейности при данном пути введения определили для зависимости  $C_{max}$  и  $AUC_{0-t}$  от вводимой дозы АХ-554. Результаты представлены на рисунке 21.

**Таблица 9.** Значения фармакокинетических показателей АХ-554 в плазме крови при внутрижелудочном введении кроликам в дозе 104,3 мг/кг

Индекс	Измерительная единица	Результат измерения
$C_{\max}$	мкг/мл	51,2
$AUC_{0-t}$	мкг×ч/мл	287,53
$AUC_{0-\infty}$	мкг×ч/мл	295,43
$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$	%	97,3
MRT	ч	6,4
$V_{ss}$	л/кг	8,1
$k_{el}$	ч <sup>-1</sup>	-0,31
$t_{1/2}$	ч	5,42
$T_{\max}$	ч	2,93
Cl	мл/кг/ч	5,1



**Рисунок 21.** Линейность изменения максимальной измеренной концентрации и  $AUC_{0-t}$  АХ-554 в плазме крови кроликов при внутрижелудочном введении в дозах 5,8; 37,4 и 104,3 мг/кг

Таким образом, при внутрижелудочном введении также обоснована линейность изменения основных фармакокинетических параметров АХ-554 в виде ФС у кроликов.

### 4.3 Тканевая концентрация АХ-554 в ткани легкого при однократном внутривенном введении

Индивидуальные значения концентраций АХ-554 в ткани легких при его внутривенном введении кроликам в средне-терапевтической дозе, соответствующей с учетом биологического переноса 37,4 мг/кг однократно, приведены в приложении А. Усредненная кривая концентрация – время для АХ-554 для ткани легких приведена на рисунке 22. Результаты расчета фармакокинетических параметров представлены в таблице 10.

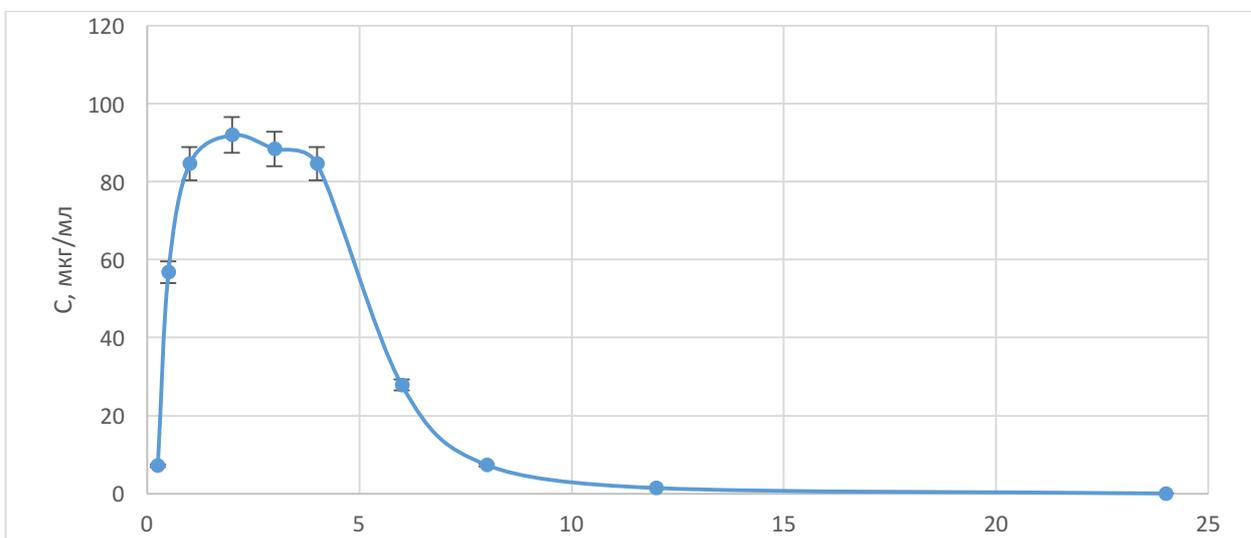


Рисунок 22. Фармакокинетические кривые АХ-554 в ткани легких при однократном внутривенном введении кроликам в дозе 37,4 мг/кг

Уравнение зависимости концентрации АХ-554 от времени имело вид:

$$C = 17,3 \times e^{-1,15t} + 2,8 \times e^{-0,12t}$$

Измеренная максимальная концентрация АХ-554 в ткани легких была равна 9,2 мкг/мл,  $AUC_{0-t} = 88,61$  мкг/мл/ч,  $AUC_{0-\infty} = 89,34$  мкг/мл/ч. Среднее время удержания составило 6,18 ч. Кажущийся объем распределения был равен 7,4 л/кг, общий клиренс достигал – 3,6 л/кг/ч.

**Таблица 10.** Значения фармакокинетических показателей АХ-554 в ткани легких при внутрижелудочном введении кроликам в дозе 37,4 мг/кг

Индекс	Измерительная единица	Результат измерения
$C_{\max}$	мкг/мл	9,20
$AUC_{0-t}$	мкг×ч/мл	88,61
$AUC_{0-\infty}$	мкг×ч/мл	89,34
$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$	%	99,1
MRT	ч	6,18
Vss	л/кг	7,4
$k_{el}$	ч <sup>-1</sup>	0,21
Cl	мл/кг/ч	3,6

Таким образом, при внутрижелудочном введении 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диок-сол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаной 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.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как известно, вещества природного происхождения в течение многих лет выступают в качестве источников создания лекарственных средств. Даже теперь, в так называемую эру рака, такие природные агенты, как адриамицин и паклитаксел каждодневно применяются в терапии злокачественных новообразований [17]. Помимо растений, произрастающих на суше, морская экосистема также рассматривается в настоящее время как безграничный ресурс для новых и эффективных фармакологических веществ [18]. Крупные достижения в области переработки и биотехнологий наряду с развитием аналитической химии, спектроскопии и высокоспецифичных и чувствительных скрининговых методов открывают широкие горизонты для использования биологических источников в создании эффективных лекарственных средств. Биофармакология как наука – сравнительно молодая отрасль знаний, использующая в качестве предмета для разработки лекарства биологический объект. За последние 20 лет были проведены широкомасштабные скрининговые исследования, позволившие обнаружить вещества с противовирусной [19], антибактериальной [20], противогрибковой [21], противопаразитарной [22], противоопухолевой [23] и противовоспалительной [24] активностью.

Как известно, нормальные клетки приобретают свойства злокачественности в результате многоэтапных генетических мутаций, что и приводит к формированию огромного количества типов злокачественных новообразований [58]. Вместе с тем, большинство видов опухолей обладают определенными общими признаками, которые должны учитываться при разработке эффективных противоопухолевых лекарственных средств. Hanahan and Weinberg идентифицировали шесть главных таргетов в человеческих опухолях: самодостаточность в сигнализации роста, нечувствительность к ингибирующим рост сигналам, избегание программируемой гибели (апоптоза), нелимитированный репликативный потенциал, поддерживающийся ангиогенез, инвазивность и метастазирование [59].

Среди большого многообразия природных веществ одним из наиболее перспективных классов соединений, среди которых уже выделен целый ряд молекул с противоопухолевой активностью, являются кумарины. В свою очередь, в структуре кумаринов естественные и полусинтетические хромены обладают антипролиферативным, антиангиогенным и антиметастатическим действием при отсутствии прямой цитотоксичности.

В нашей лаборатории ранее был разработан метод получения и изучено полусинтетическое соединение кумарина 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноат. 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 [10-16].

Наряду со значительной антибластомной активностью нами также была установлена высокая безопасность системного перорального 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-аминоэтаноат безусловно привлекательным как потенциальный кандидат 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.

Исходя из накопленных к настоящему времени сведений о фармакологии противоопухолевых хроменов – природных или полусинтетических кума-

ринов – при планировании настоящего исследования и выборе методов изучения механизма действия 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата мы приняли во внимание то, что вещества рассматриваемого класса практически лишены прямой цитотоксичности, но, вместе с тем, нарушают процессы роста и пролиферации малигнизированных клеток, инвазию и метастазирование.

При изучении механизма действия АХ-554 в опытах на животных – носителях ксенографтной модели рака легкого вещество вводили мышам внутривентрикулярно в высшей, средне-терапевтической и минимально-действующей дозах, определенных нами совместно с М.О. Дудиной [227]: МДД – 21,2 мг/кг, СТД – 137,6 мг/кг и ВТД – 384,0 мг/кг. При проведении исследований *in vitro* модельных системах применяли АХ-544 в от диапазоне от  $10^{-9}$  до  $10^{-4}$  М, с учетом того, что средняя эффективная концентрация ( $IC_{50}$ ) составляет  $2 \times 10^{-7}$  М.

Для формирования ксенографтной модели немелкоклеточного человеческого рака легкого использовали метод, описанный нами ранее [228]. Формирование экспериментальных групп животных со сформированным ксенографтом проводили при достижении опухоли размеров 100-200 мм<sup>3</sup>. 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.

Соответствие разработанной нами на первом этапе исследования ксенографтной модели реальной клинической практике изучили при параллельном лечении опухоли введением животным-акцепторам помимо исследуемого АХ-554 также референтных препаратов доксорубицина и цисплатина.

Исследуемое вещество АХ-554 при внутривенном введении в трех исследуемых дозах продемонстрировало наличие значимого противоопухолевого эффекта, сопоставимого с действием противоопухолевого антибиотика и препарата платины. При введении в течение 7 суток в минимально-действующей дозе 21,2 мг/кг индекс ТРО на 7 сутки после прекращения лечения – наиболее чувствительный индикатор эффективности – составлял 34%. Однако при увеличении дозы до средней терапевтической – 137,6 мг/кг/сутки значение индекса к 7 суткам составляло 53, а высшей терапевтической дозе – 70 [227]. Также для 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-аце-тиламиноэтаноата присуща закономерность, описанная для цисплатина, а именно сохраняющийся после отмены цитостатический эффект, проявляющийся в углублении противоопухолевой активности, и прогрессирующего уменьшения массы и объема опухоли. АХ-554 в средней и высшей терапевтических дозах оказывало заметное антиметастатическое действие в виде снижения частоты метастазирования и среднего числа поверхностных метастазов [227]. При изучении частоты ремиссий и выздоровлений при использовании АХ-554 в СТД и ВТД, частота ремиссии составила 20%.

Система микротрубочек играет ключевую роль в клеточном делении, что делает ее важной мишенью для противоопухолевых лекарственных средств [62]. Они составлены из полимеризованных гетерополимеров  $\alpha$ -,  $\gamma$ - и  $\beta$ -тубулина, образующих 13 протофиламентов. В естественном состоянии микротрубочки и свободный тубулин существуют в виде очень динамичной среды, подверженной внешним воздействиям [63]. Противоопухолевые вещества могут нарушать равновесное состояние микротрубочек, ингибируя митотическое веретено и действуя как антимиотические агенты [64]. Антимиотические средства, воздействующие на микротрубочки, можно разделить на дестабилизирующие и стабилизирующие.

На ксенографтной модели немелкоклеточного рака легкого внутрижелудочное введение АХ-554 животным-носителям опухоли оказывало дозозависимый эффект, направленный на снижение уровня биологической мишени в опухолевой ткани: при введении в МДД концентрация TUBB3 в опухоли равнялась в среднем 13,5 нг/мл, при введении в STD – 9,2, а при введении в ВТД – 3,4 нг/мл, что приближалось к значениям, полученным у интактных животных. 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.

При инкубации мономерного тубулина головного мозга быка с АХ-554 в концентрации  $2 \times 10^{-7}$  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.

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.

В живых организмах процесс программируемой клеточной гибели, заменяя терминальную фазу клеточной жизни, вовлечен в различные явления, такие как морфогенез, поддержание тканевого гомеостаза и элиминацию поврежденных клеток. Дисфункция программируемой гибели клеток и накопление генетических ошибок позволяет злокачественным клеткам выживать и распространяться – мигрировать. Программируемая гибель может быть категоризована на три процесса: апоптоз, аутофагия, и вариантная форма апоптоза, называемая некроптозом [87, 88].

Аутофагия, эволюционно законсервированный катаболический процесс, есть не что иное, как деградация клетки для очистки от поврежденных поверхностных протеинов и органелл [95]. Часто аутофагия активируется реактивными формами кислорода, гипоксией, недостатком питательных веществ, лекарственными стимулами или повреждением эндоплазматического ретикула. Ведущими белковыми структурами, участвующими в аутофагии, являются рапамициновый комплекс 1 (mTORC1), фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K), киназа анапластической лимфомы (ALK), беклин-1 и p53 [96]. PI3K/АКТ путь является таргетом mTOR киназы: когда PI3K/АКТ активированы, аутофагия ингибируется активной mTOR. И наоборот [97].

На ксенографтной модели в опухолевой ткани человека изучили экспрессию фермента PI3K/ALK. У животных контрольной серии уровень фермента повышался при сравнении с легкими интактных животных более, чем в 40 раз. Внутрижелудочное введение вещества АХ-554 оказывало дозозависимый эффект, направленный на снижение уровня биологической мишени в опухолевой ткани: при введении в МДД концентрация ALK 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. Следовательно подавление активности PI3K/ALK сигнального пути приводит к активации аутофагии опухолевых клеток.

По современным представлениям экспрессия мезенхимального трансформирующего фактора опухолевыми клетками свидетельствует о формировании фармакорезистентности ткани опухоли к классическим, в первую очередь, химиотерапевтическим средствам. 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 АХ-554 на экспрессию маркера в опухолевой

ткани доказывают это наше предположение: нами не получено значимых отличий концентрации продукта активации с-MET в группе животных, получавших АХ-554 при их сравнении ни с интактными, ни с контрольными животными.

Курсовое внутрижелудочное введение 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата в средне-терапевтической дозе сопровождалось значительным повышением экспрессии каспазы-3 опухолевыми клетками на фоне снижения интенсивности окрашивания препаратов опухоли на Vcl-2. Полученные результаты доказывают наличие апоптогенного компонента в механизме действия исследуемого соединения АХ-554.

С помощью метода иммуногистохимии нам также удалось установить, что курсовое внутрижелудочное введение 2-аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата в средне-терапевтической дозе сопровождалось значительным повышением экспрессии каспазы-3 опухолевыми клетками на фоне снижения интенсивности окрашивания препаратов опухоли на Vcl-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 внутрижелудочном введении соединения.

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 ФС АХ-554 кроликам внутривенно и внутривентриально 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 внутривентриальном 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 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 внутривентриальном введении, составляет более 90%. Соединение при внутривентриальном введении накапливается в ткани легких и определяется более 5 ч в концентрациях, превышающих  $IC_{50}$ .

## 5.1 Итоги выполнения 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-аминоэтан-оата (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-карбонитрила N-ацетил-аминоэтан-оат 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 компонент, способности активировать программируемую гибель опухолевых клеток и, в совокупности с ранее полученными данными о хронической токсичности вещества, прогнозировать его относительную безопасность.

## 5.2 Перспективы дальнейшего развития темы диссертации

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-хро-мен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаноата большой научный интерес представляет исследование влияния вещества и на другие важнейшие внутриклеточные сигнальные пути, в частности опосредуемые семейством киназ MAPK.

Прикладная перспектива полученных результатов видится в продолжении исследований готовой лекарственной формы АХ-554, позиционирование вещества как кандидата в отчетсвенное 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 анти-мических 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-аминоэтанол 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, активизирует 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-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетиламиноэтаноата 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  $2 \times 10^{-7}$  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-метокси-бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетиламиноэтаноат 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 сублетальным облучением с последующей трансплантацией человеческих лимфоцитов и гетеротопической инокуляцией опухолевой ткани.

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

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2016*; American Cancer Society: Atlanta, GA, USA, 2016.
2. Заридзе, Д.Г. Профилактика злокачественных новообразований / Д.Г. Заридзе, Д.М. Максимович // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – Т.4, №2. – С. 8-25.
3. Nicolini, A. Immunotherapy and hormone-therapy in metastatic breast cancer: A review and an update / A. Nicolini, A. Carpi, P. Ferrari, P.M. Biava, G. Rossi // *Curr. Drug Targets*. – 2016. – Vol. 17. – P. 1127-1139.
4. Khoo, B.L. Single-cell profiling approaches to probing tumor heterogeneity / B.L. Khoo, P.K. Chaudhuri, N. Ramalingam, D.S. Tan, C.T. Lim, M.E. Warkiani // *Int. J. Cancer*. – 2016. – Vol. 139. – P. 243-255.
5. Feinberg, A.P. The epigenetic progenitor origin of human cancer / A.P. Feinberg, R. Ohlsson, S. Henikoff // *Nat. Rev. Genet.* – 2016. – Vol. 7. – P. 21-33.
6. Paterson, I. The renaissance of natural products as drug candidates / I. Paterson, E.A. Anderson // *Science*. – 2005. – Vol. 310. – P. 451.
7. Howitz, K.T. Xenohormesis: Sensing the chemical cues of other species / K.T. Howitz, D.A. Sinclair // *Cell*. – 2008. – Vol. 133. – P. 387-391.
8. Newman, D.J. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years / D.J. Newman, G.M. Cragg // *J. Nat. Prod.* – 2017. – Vol. 70. – P. 461-477.
9. Fischbach, M.A. Antibiotics for emerging pathogens / M.A. Fischbach, C.T. Walsh // *Science*. – 2009. – Vol. 325. – P. 1089-1093.
10. Cragg, G.M. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents / G.M. Cragg, P.G. Grothaus, D.J. Newman // *Chem. Rev.* – 2019. – Vol. 109. – P. 3012-3043.

11. Blinova, E.V. Novel aminochromone derivative inhibits tumor growth on xenograft model of lung cancer in mice/ E. V. Blinova, M. O. Dudina, I. R. Suslova, E. A. Samishina, D. S. Blinov, D. A. Roshchin // Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research. – 2018. – Vol. 9(4). – P. 130-134.

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

13. Дудина, М.О. 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. Суслова, Д.С. Блинов // Кубанский научный медицинский вестник. –2019. – Т. 26, №1. – С. 101-107.

14. Дудина, М.О. К вопросу о противоопухолевой и антиметастатической активности вещества ЛХТ-14-10 / М.О. Дудина, Е.В. Блинова, Д.С. Блинов, А.И. Максимкин // Вестник новых медицинских технологий. – 2019. – Т. 26, №1. – С. 63-66.  
[http://rsmu.ru/fileadmin/templates/DOC/Disser/1/d\\_dudina\\_mo.pdf](http://rsmu.ru/fileadmin/templates/DOC/Disser/1/d_dudina_mo.pdf)

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

16. 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбо-нитрила N-ацетил-аминоэтаноат, проявляющий противоопухолевую активность: пат. №2674987 Рос. Федерация / Скачилова София Яковлевна, Алешина Валентина Алексеевна, Тимохина Ирина Алексеевна, Ермакова Галина Александровна, Гирева Наталия Николаевна, Блинова Екатерина Валериевна, Дудина Марина Олеговна, Ульянова Екатерина Владимировна, Блинов Дмитрий Сергеевич, Коротоножкин Алексей Викторович,

заявитель и патентообладатель — Акционерное общество "Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ" АО "ВНЦ БАВ", заявл. №201811399317.04.2018, опубликовано 14.12.2018. Бюл. №35, 2 с.

17. Elufioye, T.O. Background to pharmacognosy / T.O. Elufioye, S. Badal // In Pharmacognosy; Academic Press: Boston, MA, USA. – 2017. – P. 3-13.

18. Molinski, T.F. Drug development from marine natural products / T.F. Molinski, D.S. Dalisay, S.L. Lievens, J.P. Saludes // Nat. Rev. Drug Discov. – 2009. – Vol. 8. – P. 69-85.

19. Dang, V.T. Marine snails and slugs: A great place to look for antiviral drugs / V.T. Dang, K. Benkendorff, T. Green, P. Speck // J. Virol. – 2015. – Vol. 89. – P. 8114-8118.

20. Desbois, A.P. A fatty acid from the diatom phaeodactylum tricornutum is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) / A.P. Desbois, A. Mearns-Spragg, V.J. Smith // Mar. Biotechnol. – 2009. – Vol. 11. – P. 45-52.

21. Plaza, A. Celebesides A-C and theopapuamides B-D, depsipeptides from an Indonesian sponge that inhibit HIV-1 entry / A. Plaza, G. Bifulco, J.L. Keffer, J.R. Lloyd, H.L. Baker, C.A. Bewley // J. Org. Chem. – 2009. – Vol. 74. – P. 504-512.

22. Wei, X. Neopetrosiamine A, biologically active bis-piperidine alkaloid from the caribbean sea sponge neopetrosia proxima / X. Wei, K. Nieves, A.D. Rodríguez // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2010. – Vol. 20. – P. 5905-5908.

23. Nuijen, B. Pharmaceutical development of anticancer agents derived from marine sources / B. Nuijen, M. Bouma, C. Manada, J.M. Jimeno, J.H. Schellens, A. Bult, J.H. Beijnen // Anticancer Drugs. – 2000. – Vol. 11. – P. 793-811.

24. Asolkar, R.N. Arenamides A-C, cytotoxic NFkappaB inhibitors from the

marine actinomycete *Salinispora arenicola* / R.N. Asolkar, K.C. Freel, P.R. Jensen, W. Fenical, T.P. Kondratyuk, E.J. Park, J.M. Pezzuto // *J. Nat. Prod.* – 2009. – Vol. 72. – P. 396-402.

25. Lee, S.-M. Stalked sea squirt (*Styela clava*) tunic waste as a valuable bioresource: Cosmetic and antioxidant activities / S.-M. Lee, Y.-R. Lee, K.-S. Cho, Y.-N. Cho, H.A. Lee, D.-Y. Hwang, Y.-J. Jung, H.-J. Son // *Process Biochem.* – 2015. – Vol. 50. – P. 1977-1984.

26. Abdelmohsen, U.R. Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections / U.R. Abdelmohsen, S. Balasubramanian, T.A. Oelschlaeger, T. Grkovic, N.B. Pham, R.J. Quinn, U. Hentschel // *Lancet Infect. Dis.* – 2017. – Vol. 17. – e30–e41.

27. Kong, D.-X. Marine natural products as sources of novel scaffolds: Achievement and concern / D.-X. Kong, Y.-Y. Jiang, H.-Y. Zhang // *Drug Discov. Today.* – 2010. – Vol. 15. – P. 884-886.

28. Hu, G.-P. Statistical research on natural products based on data obtained between 1985 and 2008 / G.-P. Hu, J. Yuan, L. Sun, Z.-G. She, J.-H. Wu, X.-J. Lan, X. Zhu, Y.-C. Lin, S.-P. Chen // *Mar. Drugs.* – 2011. – Vol. 9. – P. 514-525.

29. Leal, M.C. Bioprospecting of marine invertebrates for new natural products—A chemical and zoogeographical perspective / M.C. Leal, C. Madeira, C.A. Brandao, J. Puga, R. Calado // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17. – P. 9842-9854.

30. Voultziadou, E. Marine invertebrate diversity in Aristotle's zoology / E. Voultziadou, D. Vafidis // *Contrib. Zool.* – 2007. – Vol. 76. – P. 103-120.

31. Haefner, B. Drugs from the deep: Marine natural products as drug candidates / B. Haefner // *Drug Discov. Today.* – 2013. – Vol. 8. – P. 536-544.

32. Mayer, A.M.S. Natural pharmacology in 2009–2011: Natural compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action / A.M.S. Mayer, A.D. Rodríguez, O.

Taglialatela-Scafati, N. Fusetani // *Nat. Drugs.* – 2013. – Vol. 11. – P. 2510-2573.

33. Kukula-Koch, W.A. Alkaloids A2—Badal, Simone. Chapter Two. / W.A. Kukula-Koch, J. Widelski / In *Pharmacognosy*; Delgoda, R., Ed.; Academic Press: Boston, MA, USA. – 2017. – P. 163-198.

34. Zhang, Y. Alkaloids produced by endophytic fungi: A review / Y. Zhang, T. Han, Q. Ming, L. Wu, K. Rahman, L. Qin // *Nat. Prod. Commun.* – 2012. – Vol. 7. – P. 963-968.

35. Rocha-Santos, T. Introduction to the analysis of bioactive compounds in marine samples / T. Rocha-Santos, A.C. Duarte / In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014. – Vol. 65. – P. 1-13.

36. Molinski, T.F. Natural pyridoacridine alkaloids: Structure, synthesis, and biological chemistry / T.F. Molinski // *Chem. Rev.* – 1993. – Vol. 93. – P. 1825-1838.

37. Hertiani, T. From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges / T. Hertiani, R. Edrada-Ebel, S. Ortlepp, R.W.M. van Soest, N.J. de Voogd, V. Wray, U. Hentschel, S. Kozytska, W.E.G. Müller, P. Proksch // *Bioorg. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 18. – P. 1297-1311.

38. Vik, A. (+)-Agelasine D: Improved synthesis and evaluation of antibacterial and cytotoxic activities / A. Vik, E. Hedner, C. Charnock, Ø. Samuelsen, R. Larsson, L.L. Gundersen, L. Bohlin // *J. Nat. Prod.* – 2006. – Vol. 69. – P. 381-386.

39. Bringmann, G. Ancistectorine D, a naphthylisoquinoline alkaloid with antiprotozoal and antileukemic activities, and further 5,8'- and 7,1'-linked metabolites from the Chinese liana *Ancistrocladus tectorius* / G. Bringmann, R. Seupel, D. Feineis, G. Zhang, M. Xu, J. Wu, M. Kaiser, R. Brun, E.-J. Seo, T. Efferth // *Fitoterapia.* – 2016. – Vol. 115. – P. 1-8.

40. Appenzeller, J. Agelasines J, K, and L from the Solomon Islands marine

sponge *Agelas cf. Mauritiana* / J. Appenzeller, G. Mihci, M.T. Martin, J.F. Gallard, J.L. Menou, N. Boury-Esnault, J. Hooper, S. Petek, S. Chevalley, A. Valentin, et al. // *J. Nat. Prod.* – 2008. – Vol. 71. – P. 1451-1454.

41. Chu, M.-J. Three new non-brominated pyrrole alkaloids from the South China Sea sponge *Agelas nakamurai* / M.-J. Chu, X.-L. Tang, G.-F. Qin, N.J. de Voogd, P.-L. Li, G.-Q. Li // *Chin. Chem. Lett.* – 2017. – Vol. 28. – P. 1210-1213.

42. Hochmuth, T. Polyketide synthases of bacterial symbionts in sponges— Evolution-based applications in natural products research / T. Hochmuth, J. Piel // *Phytochemistry.* – 2009. – Vol. 70. – P. 1841-1849.

43. Hopwood, D.A. Complex enzymes in microbial natural product biosynthesis, part B: Polyketides, aminocoumarins and carbohydrates Preface. / D.A. Hopwood // *Methods Enzymol.* – 2009. – Vol. 459. – P. 4624-4625.

44. Tsukada, M. Chemical constituents of a marine fungus, *Arthrimum sacchari* / M. Tsukada, M. Fukai, K. Miki, T. Shiraishi, T. Suzuki, K. Nishio, T. Sugita, M. Ishino, K. Kinoshita, K. Takahashi, et al. // *J. Nat. Prod.* – 2011. – Vol. 74. – P. 1645-1649.

45. Ebel, R. Terpenes from marine-derived fungi / R. Ebel // *Mar. Drugs.* – 2010. – Vol. 8. – P. 2340-2368.

46. Kim, S.-K. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review / S.-K. Kim, I. Wijesekara // *J. Funct. Foods.* – 2010. – Vol. 2. – P. 1-9.

47. Cheung, R.C. Natural peptides: Bioactivities and applications / R.C. Cheung, T.B. Ng, J.H. Wong // *Nat. Drugs.* – 2015. – Vol. 13. – P. 4006-4043.

48. Agrawal, S. The pharmacological potential of non-ribosomal peptides from marine sponge and tunicates / S. Agrawal, A. Adholeya, S.K. Deshmukh // *Front. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 7. – Art. No. 333.

49. Mehbub, M.F. Marine sponge derived natural products between 2001 and

2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives / M.F. Mehbub, J. Lei, C. Franco, W. Zhang // *Mar. Drugs*. – 2014. – Vol. 12. – P. 4539-4577.

50. Kang, H.K. The effects of natural carbohydrates and glycosylated compounds on human health / H.K. Kang, C.H. Seo, Y. Park // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – P. 6018-6056.

51. Laurienzo, P. Natural polysaccharides in pharmaceutical applications: An overview / P. Laurenzo // *Nat. Drugs*. – 2010. – Vol. 8. – P. 2435-2465.

52. Shi, L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review / L. Shi // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2016. – Vol. 92. – P. 37-48.

53. Safari, D. Identification of the smallest structure capable of evoking opsonophagocytic antibodies against *Streptococcus pneumoniae* type 14 / D. Safari, H.A. Dekker, J.A. Joosten, D. Michalik, A.C. de Souza, R. Adamo, M. Lahmann, A. Sundgren, S. Oscarson, J.P. Kamerling, et al. // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76. – P. 4615-4623.

54. He, X. Synergistic combination of marine oligosaccharides and azithromycin against *Pseudomonas aeruginosa* / X. He, H.-M. Hwang, W.G. Aker, P. Wang, Y. Lin, X. Jiang, X. He // *Microbiol. Res.* – 2014. – Vol. 169. – P. 759-767.

55. Kren, V. Glycosides in medicine: “The role of glycosidic residue in biological activity” / V. Kren, L. Martinkova // *Curr. Med. Chem.* – 2001. – Vol. 8. – P. 1303-1328.

56. Gandhi, N.S. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins / N.S. Gandhi, R.L. Mancera // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2008. – Vol. 72. – P. 455–482.

57. Coombe, D.R. Heparan sulfate-protein interactions: Therapeutic potential through structure-function insights / D.R. Coombe, W.C. Kett // *Cell. Mol. Life Sci.*

– 2005. – Vol. 62. – P. 410-424.

58. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations / P.C. Nowell // *Science*. – 1976. – Vol. 194. – P. 23-28.

59. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell* – 2000. – Vol. 100. – P. 57-70.

60. Ruiz-Torres, V. An Updated Review on Marine Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for the Discovery of Small-Molecule Cancer Drugs / V. Ruiz-Torres, J. A. Encinar, M. Herranz-López, A. Pérez-Sánchez, V. Galiano, E. Barrajon-Catalán, V. Micol // *Molecules*. – 2017. – Vol. 22. – ID 1037.

61. Jordan, M.A. Microtubules as a target for anticancer drugs / M.A. Jordan, L. Wilson // *Nat. Rev. Cancer*. – 2004. – Vol. 4. – P. 253-265.

62. Hadfield, J.A. Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs / J.A. Hadfield, S. Ducki, N. Hirst, A.T. McGown // *Prog. Cell Cycle Res.* – 2003. – Vol. 5. – P. 309-325.

63. Wood, K.W. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target / K.W. Wood, W.D. Cornwell, J.R. Jackson // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 1. – P. 370-377.

64. Avendaño, C. Chapter 9 — Anticancer drugs targeting tubulin and microtubules / C. Avendaño, J.C. Menéndez / *In Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 2nd ed.; Elsevier: Boston, MA, USA, 2015. – P. 359-390.

65. Mukhtar, E. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy / E. Mukhtar, V.M. Adhami, H. Mukhtar // *Mol. Cancer Ther.* – 2014. – Vol. 13. – P. 275-284.

66. Kaur, R. Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview / R. Kaur, G. Kaur, R.K. Gill, R. Soni, J. Bariwal // *Eur. J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 87. – P. 89-124.

67. Bai, R. Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine

animal / R. Bai, G.R. Petit, E. Hamel // *Biochem. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 39. – P. 1941-1949.

68. Edler, M.C. Inhibition of tubulin polymerization by vitilevuamide, a bicyclic marine peptide, at a site distinct from colchicine, the vinca alkaloids, and dolastatin 10 / M.C. Edler, A.M. Fernandez, P. Lassota, C.M. Ireland, L.R. Barrows // *Biochem. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 63. – P. 707-715.

69. Jordan, M.A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin / M.A. Jordan // *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* – 2002. – Vol. 2. – P. 1-17.

70. Luesch, H. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatatin 1 / H. Luesch, R.E. Moore, V.J. Paul, S.L. Mooberry, T.H. Corbett // *J. Nat. Prod.* – 2001. – Vol. 64. – P. 907-910.

71. Nicolaou, K.C. Total synthesis of the originally proposed and revised structures of palmerolide A / K.C. Nicolaou, R. Guduru, Y.P. Sun, B. Banerji, D.Y. Chen // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* – 2007. – Vol. 46. – P. 5896-5900.

72. Llorca, O. Analysis of the interaction between the eukaryotic chaperonin CCT and its substrates actin and tubulin / O. Llorca, J. Martin-Benito, P. Gomez-Puertas, M. Ritco-Vonsovici, K.R. Willison, J.L. Carrascosa, J.M. Valpuesta // *J. Struct. Biol.* – 2001. – Vol. 135. – P. 205-218.

73. Lachia, M. The synthetic challenge of diazonamide, a macrocyclic indolebis-oxazole marine natural product / M. Lachia, C.J. Moody // *Nat. Prod. Rep.* – 2008. – Vol. 25. – P. 227-253.

74. Cruz-Monserrate, Z. Diazonamide a and a synthetic structural analog: Disruptive effects on mitosis and cellular microtubules and analysis of their interactions with tubulin / Z. Cruz-Monserrate, H.C. Vervoort, R. Bai, D.J. Newman, S.B. Howell, G. Los, J.T. Mullaney, M.D. Williams, G.R. Pettit, W. Fenical, et al. // *Mol. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 63. – P. 1273-1280.

75. Chan, A. Peloruside A inhibits microtubule dynamics in abrest cancer cell line MCF7 / A. Chan, P.M. Andrae, P.T. Northcote, J.H. Miller // *Investig. New Drugs*. – 2011. – Vol. 29. – P. 615-626.

76. Chen, Q.H.; Kingston, D.G. Zampanolide and dactylolide: Cytotoxic tubulin-assembly agents and promising anticancer leads / Q.H. Chen, D.G. Kingston // *Nat. Prod. Rep.* – 2014. – Vol. 31. – P. 1202-1226.

77. Field, J.J. Microtubule-stabilizing activity of zampanolide, a potent macrolide isolated from the tongan marine sponge *Cacospongia mycofijiensis* / J.J. Field, A.J. Singh, A. Kanakkanthara, T. Halafihi, P.T. Northcote, J.H. Miller // *J. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 52. – P. 7328-7332.

78. Zask, A. Hybrids of the hemiasterlin analogue taltobulin and the dolastatins are potent antimicrotubule agents / A. Zask, J. Kaplan, S. Musto, F. Loganzo // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 127. – P. 17667-17671.

79. Uckun, F.M. Spongistatins as tubulin targeting agents / F.M. Uckun, C. Mao, S.T. Jan, H. Huang, A.O. Vassilev, C.S. Navara, R.K. Narla // *Curr. Pharm. Des.* – 2001. – Vol. 7. – P. 1291-1296.

80. Paterson, I. Stereochemical determination of dictyostatin, a novel microtubule-stabilising macrolide from the marine sponge *Corallistidae* sp. / I. Paterson, R. Britton, O. Delgado, A.E. Wright // *Chem. Commun. (Camb.)*. – 2014. – Vol. 1. – P. 632-633.

81. Madiraju, C. Tubulin assembly, taxoid site binding, and cellular effects of the microtubule-stabilizing agent dictyostatin / C. Madiraju, M.C. Edler, E. Hamel, B.S. Raccor, R. Balachandran, G. Zhu, K.A. Giuliano, A. Vogt, Y. Shin, J.H. Fournier, et al. // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44. – P. 15053-15063.

82. Field, J.J. Zampanolide, a potent new microtubule stabilizing agent, covalently reacts with the taxane luminal site in both tubulin  $\alpha$ ,  $\beta$ -heterodimers and microtubules / J.J. Field, B. Pera, E. Calvo, A. Canales, D. Zurwerra, C. Trigili, J. Rodríguez-Salarichs, R. Matesanz, A. Kanakkanthara, S.J. Wakefield, et al. // *Chem.*

Biol. – 2012. – Vol. 19. – P. 686-698.

83. Isbrucker, R.A. Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of marine sponge origin / R.A. Isbrucker, J. Cummins, S.A. Pomponi, R.E. Longley, A.E. Wright // *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – Vol. 66. – P. 75-82.

84. Brunden, K.R. Mt-stabilizer, dictyostatin, exhibits prolonged brain retention and activity: Potential therapeutic implications / K.R. Brunden, N.M. Gardner, M.J. James, Y. Yao, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, I. Paterson, C. Ballatore, A.B. Smith 3rd // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 4. – P. 886-889.

85. Vollmer, L.L. A simplified synthesis of novel dictyostatin analogues with in vitro activity against epothilone b-resistant cells and antiangiogenic activity in zebrafish embryos / L.L. Vollmer, M. Jimenez, D.P. Camarco, W. Zhu, H.N. Daghestani, R. Balachandran, C.E. Reese, J.S. Lazo, N.A. Hukriede, D.P. Curran, et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2011. – Vol. 10. – P. 994-1006.

86. Churchill, C.D. The unique binding mode of laulimalide to two tubulin protofilaments / C.D. Churchill, M. Klobukowski, J.A. Tuszynski // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2015. – Vol. 86. – P. 190-199.

87. Su, Z. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis / Z. Su, Z. Yang, Y. Xu, Y. Chen, Q. Yu // *Mol. Cancer.* – 2015. – Vol. 14. – P. 48.

88. Sun, Y. Programmed cell death and cancer / Y. Sun, Z.L. Peng // *Postgrad. Med. J.* – 2009. – Vol. 85. – P. 134-140.

89. Debnath, J. Does autophagy contribute to cell death? / J. Debnath, E.H. Baehrecke, G. Kroemer // *Autophagy.* – 2015. – Vol. 1. – P. 66-74.

90. Fulda, S. Apoptosis signaling in cancer stem cells / S. Fulda, S. Pervaiz // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2016. – Vol. 42. – P. 31-38.

91. Kroemer, G. Mitochondrial control of apoptosis: An introduction / G. Kroemer // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 304. – P. 433-435.

92. Oliver, L. The role of caspases in cell death and differentiation / L. Oliver,

F.M. Vallette // *Drug Resist. Updat.* – 2005. – Vol. 8. – P. 163-170.

93. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death / S. Elmore // *Toxicol. Pathol.* – 2007. – Vol. 35. – P. 495-516.

94. Cory, S. The Bcl 2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch / S. Cory, J.M. Adams // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – Vol. 2. – P. 647-656.

95. Mathew, R. Role of autophagy in cancer / R. Mathew, V. Karantza-Wadsworth, E. White // *Nat. Rev. Cancer.* – 2007. – Vol. 7. – P. 961-967.

96. Heras-Sandoval, D. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration / D. Heras-Sandoval, J.M. Perez-Rojas, J. Hernandez-Damian, J. Pedraza-Chaverri // *Cell Signal.* – 2014. – Vol. 26. – P. 2694-2701.

97. Mukhtar, E. Apoptosis and autophagy induction as mechanism of cancer prevention by naturally occurring dietary agents / E. Mukhtar, V.M. Adhami, N. Khan, H. Mukhtar // *Curr. Drug Targets.* – 2012. – Vol. 13. – P. 1831-1841.

98. Ebada, S.S. Two new jaspamide derivatives from the marine sponge *Jaspis splendens* / S.S. Ebada, V. Wray, N.J. de Voogd, Z. Deng, W. Lin, P. Proksch // *Mar. Drugs.* – 2009. – Vol. 7. – P. 435-444.

99. Odaka, C. Jasplakinolide induces apoptosis in various transformed cell lines by a caspase-3-like protease-dependent pathway / C. Odaka, M.L. Sanders, P. Crews // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2000. – Vol. 7. – P. 947-952.

100. Cheng, L. A novel polypeptide extracted from *Ciona Savignyi* induces apoptosis through a mitochondrial-mediated pathway in human colorectal carcinoma cells / L. Cheng, C. Wang, H. Liu, F. Wang, L. Zheng, J. Zhao, E. Chu, X. Lin // *Clin. Colorectal Cancer.* – 2012. – Vol. 11. – P. 207-214.

101. Guzii, A.G. Monanchocidin: A new apoptosis-inducing polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra* / A.G. Guzii, T.N. Makarieva, V.A. Denisenko, P.S. Dmitrenok, A.S. Kuzmich, S.A. Dyshlovoy, V.B.

Krasokhin, V.A. Stonik // *Org. Lett.* – 2010. – Vol. 12. – P. 4292-4295.

102. Westley, C.B. Enhanced acute apoptotic response to azoxymethane-induced DNA damage in the rodent colonic epithelium by tyrian purple precursors: A potential colorectal cancer chemopreventative / C.B. Westley, C.M. McIver, C.A. Abbott, R.K. LeLeu, K. Benkendorff // *Cancer Biol. Ther.* – 2014. – Vol. 9. – P. 371-379.

103. Benkendorff, K. Bioactivity of the Murex Homeopathic Remedy and of Extracts from an Australian Muricid Mollusc against Human Cancer Cells / K. Benkendorff, C.M. McIver, C.A. Abbott // *Evid. Based Complement. Altern. Med.* – 2011. – Vol. 2011. – ID 879585.

104. Vine, K.L. In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives / K.L. Vine, J.M. Locke, M. Ranson, S.G. Pyne, J.B. Bremner // *Bioorg. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 15. – P. 931-938.

105. Shinkre, B.A. Analogs of the marine alkaloid makaluvamines: Synthesis, topoisomerase II inhibition, and anticancer activity / B.A. Shinkre, K.P. Raisch, L. Fan, S.E. Velu // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2012. – Vol. 17. – P. 2890-2893.

106. Casapullo, A. Makaluvamine P, a new cytotoxic pyrroloiminoquinone from *Zyzzya cf. Fuliginosa* / A. Casapullo, A. Cutignano, I. Bruno, G. Bifulco, C. Debitus, L. Gomez-Paloma, R. Riccio // *J. Nat. Prod.* – 2011. – Vol. 64. – P. 1354-1356.

107. Chen, T. Experimental therapy of ovarian cancer with synthetic makaluvamine analog: In vitro and in vivo anticancer activity and molecular mechanisms of action / T. Chen, Y. Xu, H. Guo, Y. Liu, P. Hu, X. Yang, X. Li, S. Ge, S.E. Velu, D.H. Nadkarni, et al. // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6. – Art. e20729.

108. Bielenberg, D.R. The contribution of angiogenesis to the process of metastasis / D.R. Bielenberg, B.R. Zetter // *Cancer J.* – 2015. – Vol. 21. – P. 267-273.

109. Coultas, L. Endothelial cells and VEGF in vascular development / L.

Coultas, K. Chawengsaksophak, J. Rossant // *Nature*. – 2005. – Vol. 438. – P. 937-945.

110. Klagsbrun, M. Molecular angiogenesis / M. Klagsbrun, M.A. Moses // *Chem. Biol.* – 1999. – Vol. 6. – R217-R224.

111. Matsumoto, T. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis / T. Matsumoto, S. Bohman, J. Dixelius, T. Berge, A. Dimberg, P. Magnusson, L. Wang, C. Wikner, J.H. Qi, C. Wernstedt, et al. // *EMBO J.* – 2015. – Vol. 24. – P. 2342-2353.

112. Zhang, S. SKLB1002, a novel potent inhibitor of VEGF receptor 2 signaling, inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo / S. Zhang, Z. Cao, H. Tian, G. Shen, Y. Ma, H. Xie, Y. Liu, C. Zhao, S. Deng, Y. Yang, et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 17. – P. 4439-4450.

113. Nishi, M. Cell binding isoforms of vascular endothelial growth factor-A (VEGF189) contribute to blood flow-distant metastasis of pulmonary adenocarcinoma / M. Nishi, Y. Abe, Y. Tomii, H. Tsukamoto, H. Kijima, H. Yamazaki, Y. Ohnishi, M. Iwasaki, H. Inoue, Y. Ueyama, et al. // *Int. J. Oncol.* – 2005. – Vol. 26. – P. 1517-1524.

114. Zetter, B.R. Angiogenesis and tumor metastasis / B.R. Zetter // *Annu. Rev. Med.* – 1998. – Vol. 49. – P. 407-424.

115. Noujaim, D. N-Myc and Bcl-2 coexpression induces MMP-2 secretion and activation in human neuroblastoma cells / D. Noujaim, C.M. van Golen, K.L. van Golen, A. Grauman, E.L. Feldman // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21. – P. 4549-4557.

116. Criscitiello, C. Tumor-stroma crosstalk: Targeting stroma in breast cancer / C. Criscitiello, A. Esposito, G. Curigliano // *Curr. Opin. Oncol.* – 2014. – Vol. 26. – P. 551-555.

117. Cobleigh, M.A. A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in

previously treated metastatic breast cancer / M.A. Cobleigh, V.K. Langmuir, G.W. Sledge, K.D. Miller, L. Haney, W.F. Novotny, J.D. Reimann, A. Vassel // *Semin. Oncol.* – 2013. – Vol. 30. – P. 117-124.

118. Kubota, Y. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy / Y. Kubota // *Keio J. Med.* – 2012. – Vol. 61. – P. 47-56.

119. Nguyen, V.T. Matrix metalloproteinases (MMPs) inhibitory effects of an octameric oligopeptide isolated from abalone *Haliotis discus hannai* / V.T. Nguyen, Z.J. Qian, B. Ryu, K.N. Kim, D. Kim, Y.M. Kim, Y.J. Jeon, W.S. Park, I.W. Choi, G.H. Kim, et al. // *Food Chem.* – 2013. – Vol. 141. – P. 503-509.

120. Arai, M. Stylistamide X, a new proline-rich cyclic octapeptide as an inhibitor of cell migration, from an Indonesian marine sponge of *Stylissa* sp. / M. Arai, Y. Yamano, M. Fujita, A. Setiawan, M. Kobayashi // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2012. – Vol. 22. – P. 1818-1821.

121. Shaala, L.A. Subereamolline Aasa potent breast cancer migration, invasion and proliferation inhibitor and bioactive dibrominated alkaloids from the red sea sponge *Pseudoceratina arabica* / L.A. Shaala, D.T.A. Youssef, M. Sulaiman, F.A. Behery, A.I. Foudah, K.A.E. Sayed // *Mar. Drugs.* – 2012. – Vol. 10. – P. 2492-2508.

122. Aoki, S. Cortistatins A, B, C, and D, anti-angiogenic steroidal alkaloids, from the marine sponge *Corticium simplex* / S. Aoki, Y. Watanabe, M. Sanagawa, A. Setiawan, N. Kotoku, M. Kobayashi // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128. – P. 3148-3149.

123. Rodriguez-Nieto, S. Antiangiogenic activity of aeroplysinin-1, a brominated compound isolated from a marine sponge / S. Rodriguez-Nieto, M. Gonzalez-Iriarte, R. Carmona, R. Munoz-Chapuli, M.A. Medina, A.R. Quesada // *FASEB J.* – 2012. – Vol. 16. – P. 261-263.

124. Roskelley, C.D. Inhibition of tumor cell invasion and angiogenesis by motuporamines / C.D. Roskelley, D.E. Williams, L.M. McHardy, K.G. Leong, A.

Troussard, A. Karsan, R.J. Andersen, S. Dedhar, M. Roberge // *Cancer Res.* – 2011. – Vol. 61. – P. 6788-6794.

125. Mathieu, V. Cyclic versus hemibastadins. Pleiotropic anti-cancer effects: From apoptosis to anti-angiogenic and anti-migratory effects / V. Mathieu, N. Wauthoz, F. Lefranc, H. Niemann, K. Amighi, R. Kiss, P. Proksch // *Molecules.* – 2013. – Vol. 18. – P. 3543-3561.

126. Barbieri, F. Emerging targets in pituitary adenomas: Role of the CXCL12/CXCR4-R7 system / F. Barbieri, S. Thellung, R. Wurth, F. Gatto, A. Corsaro, V. Villa, M. Nizzari, M. Albertelli, Ferone, D. Florio // *Int. J. Endocrinol.* – 2014. – Vol. 2014. - ID 753524.

127. Cipres, A. Scepterin, a marine natural compound, inhibits cell motility in a variety of cancer cell lines / A. Cipres, D.P. O'Malley, K. Li, D. Finlay, P.S. Baran, K. Vuori // *ACS Chem. Biol.* – 2010. – Vol. 5. – P. 195-202.

128 El Sayed, K.A. Latrunculin A and its C-17-O-carbamates inhibit prostate tumor cell invasion and HIF-1 activation in breast tumor cells / K.A. El Sayed, M.A. Khanfar, H.M. Shallal, A. Muralidharan, B. Awate, D.T. Youssef, Y. Liu, Y.D. Zhou, D.G. Nagle, G. Shah // *J. Nat. Prod.* – 2008. – Vol. 71. – P. 396-402.

129. El Sayed, K.A. Bioactive natural and semisynthetic latrunculins / K.A. El Sayed, D.T. Youssef, D. Marchetti // *J. Nat. Prod.* – 2006. – Vol. 69. – P. 219-223.

130. Spector, I. Latrunculins —Novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D / I. Spector, N.R. Shochet, D. Blasberger, Y. Kashman // *Cell Motil. Cytoskeleton.* – 1989. – Vol. 13. – P. 127-144.

131. Lu, H. The microtubule binding drug laulimalide inhibits vascular endothelial growth factor-induced human endothelial cell migration and is synergistic when combined with docetaxel (taxotere) / H. Lu, J. Murtagh, E.L.

Schwartz // *Mol. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 69. – P. 1207-1215.

132. Zhao, Q. Ds-echinoside A, a new triterpene glycoside derived from sea cucumber, exhibits antimetastatic activity via the inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent MMP-9 and VEGF expressions / Q. Zhao, Z.D. Liu, Y. Xue, J.F. Wang, H. Li, Q.J. Tang, Y.M. Wang, P. Dong, C.H. Xue // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* – 2011. – Vol. 12. – P. 534-544.

133. Zhao, Q. Differential effects of sulfated triterpene glycosides, holothurin A1, and 24-dehydroechinoside A, on antimetastatic activity via regulation of the MMP-9 signal pathway / Q. Zhao, Y. Xue, Z.D. Liu, H. Li, J.F. Wang, Z.J. Li, Y.M. Wang, P. Dong, C.H. Xue // *J. Food Sci.* – 2016. – Vol. 75. – H280-H288.

134. Kotoku, N. Synthesis of BC-ring model of globostellatic acid X methyl ester, an anti-angiogenic substance from marine sponge / N. Kotoku, N. Tamada, A. Hayashi, M. Kobayashi // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2008. – Vol. 18. – P. 3532-3535.

135. Foudah, A.I. Optimization of marine triterpene siphonolols as inhibitors of breast cancer migration and invasion / A.I. Foudah, S. Jain, B.A. Busnena, K.A. El Sayed // *Chem Med Chem.* – 2013. – Vol. 8. – P. 497-510.

136. Al Marzouqi, N. Frondoside A inhibits human breast cancer cell survival, migration, invasion and the growth of breast tumor xenografts / N. Al Marzouqi, R. Iratni, A. Nemmar, K. Arafat, M. Ahmed Al Sultan, J. Yasin, P. Collin, J. Mester, T.E. Adrian, S. Attoub // *Eur. J. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 668. – P. 25-34.

137. Kopf, S. In vitro characterisation of the anti-intravasative properties of the marine product heteronemin / S. Kopf, K. Viola, A.G. Atanasov, K. Jarukamjorn, L. Rarova, N Kretschy, M. Teichmann, C. Vonach, P. Saiko, B. Giessrigl, et al. // *Arch. Toxicol.* – 2013. – Vol. 87. – P. 1851-1861.

138. Kazlauskas, R. Heteronemin, a new scalarin types ester terpene from the sponge *Heteronema Erecta* / R. Kazlauskas, P.T. Murphy, R.J. Quinn, R.J. Wells // *Tetrahedron Lett.* – 1976. – Vol. 17. – P. 2631-2634.

139. Bernstein, J. Sarcophine, a new epoxycembranolide from marine origin / J. Bernstein, U. Shmeuli, E. Zadock, Y. Kashman, I. Néeman // *Tetrahedron*. – 1974. – Vol. 30. – P. 2817-2824.
140. Sawant, S.S. Biocatalytic and antimetastatic studies of the marine cembranoids sarcophine and 2-epi-16-deoxysarcophine / S.S. Sawant, D.T. Youssef, J. Reiland, M. Ferniz, D. Marchetti, K.A. El Sayed // *J. Nat. Prod.* – 2006. – Vol. 69. – P. 1010-1013.
141. Hassan, H.M. Semisynthetic analogues of the marine cembranoid sarcophine as prostate and breast cancer migration inhibitors / H.M. Hassan, A.A. Sallam, R. Mohammed, M.S. Hifnawy, D.T.A. Youssef, K.A. El Sayed // *Bioorg. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 19. – P. 4928-4934.
142. Radwan, M.M. Sinulodurins A and B, antiproliferative and anti-invasive diterpenes from the soft coral *Sinularia dura* / M.M. Radwan, S.P. Manly, K.A. El Sayed, V.B. Wali, P.W. Sylvester, B. Awate, G. Shah, S.A. Ross // *J. Nat. Prod.* – 2008. – Vol. 71. – P. 1468-1471.
143. Warabi, K. Strongylophorine-26, a new meroditerpenoid isolated from the marine sponge *Petrosia (Strongylophora) corticata* that exhibits anti-invasion activity / K. Warabi, L.M. McHardy, L. Matainaho, R. van Soest, C.D. Roskelley, M. Roberge, R.J. J. Andersen // *Nat. Prod.* – 2004. – Vol. 67. – P. 1387-1389.
144. Kong, D. Antiproliferative and antiangiogenic activities of smenospongine, a marine sponge sesquiterpene aminoquinone / D. Kong, T. Yamori, M. Kobayashi, H. Duan // *Mar. Drugs*. – 2011. – Vol. 9. – P. 154-161.
145. Wen, Z.-H. A neuroprotective sulfone of marine origin and the in vivo anti-inflammatory activity of an analogue / Z.-H. Wen, C.-H. Chao, M.-H. Wu, J.-H. Sheu // *Eur. J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 45. – P. 5998-6004.
146. Takei, M. Polyacetylenediols regulate the function of human monocyte-derived dendritic cells / M. Takei, A. Umeyama, N. Shoji, T. Hashimoto // *Int. Immunopharmacol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 913-921.

147. Pearson, G. Mitogen-activated protein (map) kinase pathways: Regulation and physiological functions / G. Pearson, F. Robinson, T.B. Gibson, B.E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, M.H. Cobb // *Endocr. Rev.* – 2001. – Vol. 22. – P. 153-183.
148. Brown, M.D. Protein scaffolds in MAP kinase signalling / M.D. Brown, D.B. Sacks // *CellSignal.* – 2009. – Vol. 21. – P. 462-469.
149. Santen, R.J. The role of mitogen-activated protein (map) kinase in breast cancer / R.J. Santen, R.X. Song, R. McPherson, R. Kumar, L. Adam, M.-H. Jeng, W. Yue // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 80. – P. 239-256.
150. Slomovitz, B.M. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer / B.M. Slomovitz, R.L. Coleman // *Clin. Cancer Res.* – 2012. – Vol. 18. – P. 5856-5864.
151. Griner, E.M. Proteinkinase can do ther diacylglycerol effectors in cancer / E.M. Griner, M.G. Kazanietz // *Nat. Rev. Cancer.* – 2007. – Vol. 7. – P. 281-294.
152. Avruch, J. Map kinase pathways: The first twenty years / J. Avruch // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* – 2007. – Vol. 1773. – P. 1150–1160.
153. Santos-Sánchez, N.F.; Salas-Coronado, R.; Hernández-Carlos, B.; Villanueva-Cañongo, C. Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. In *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*; IntechOpen: London, UK, 2019.
154. Venugopala, K.N. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity / K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav // *BioMed. Res. Int.* – 2013. – Vol. 2013. – ID 963248.
155. Stefanachi, A. Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds / A. Stefanachi, F. Leonetti, L. Pisani, M. Catto, A. Carotti // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23. – P. 250.
156. Jain, P. Coumarin: Chemical and pharmacological profile / P. Jain, H.

Joshi // JAPS. – 2012. – Vol. 2. – P. 236-240.

157. Walasek, M. Bioactivity-guided isolation of antimicrobial coumarins from *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae) fruits by high-performance counter-current chromatography / M. Walasek, A. Grzegorzcyk, A. Malm, K. Skalicka-Wozniak // *Food Chem.* – 2015. – Vol. 186. – P. 133-138.

158. Teixeira, D.M. Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves / D.M. Teixeira, R.F. Patão, A.V. Coelho, C.T. da Costa // *J. Chromatogr. A* 2006, 1103, 22–28.

159. Hrobonová, K. Determination of dicoumarol in *Melilotus officinalis* L. by using molecularly imprinted polymer solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography / K. Hrobonová, A. Machynáková, J. Čížmárik // *J. Chromatogr. A.* – 2018. – Vol. 1539. – P. 93-102.

160. Kassim, N.K. Antioxidant activity-guided separation of coumarins and lignan from *Melicope glabra* (Rutaceae) / N.K. Kassim, M. Rahmani, A. Ismail, M.A. Sukari, G.C.L. Ee, N.M. Nasir, K. Awang // *Food Chem.* – 2013. – Vol. 139. – P. 87-92.

161. Widelski, J. Isolation and Antimicrobial Activity of Coumarin Derivatives from Fruits of *Peucedanum luxurians* Tamamsch / J. Widelski, S.V. Luca, A. Skiba, I. Chinou, L. Marcourt, J.-L. Wolfender, K. Skalicka-Wozniak // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23. – ID 1222.

162. Pfeifer, I. Determination of coumarins in the roots of *Angelica dahurica* by supercritical fluid chromatography / I. Pfeifer, A. Muraier, M. Ganzera // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – Vol. 129. – P. 246-251.

163. Shokoohinia, Y. Antiviral and cytotoxic evaluation of coumarins from *Prangos ferulacea* / Y. Shokoohinia, S.-E. Sajjadi, S. Gholamzadeh, A. Fattahi, M. Behbahani // *Pharm. Biol.* – 2014. – Vol. 52. – P. 1543-1549.

164. Monsef-Esfahani, H.R. Coumarin compounds of *Biebersteinia multifida* roots show potential anxiolytic effects in mice / H.R. Monsef-Esfahani, M. Amini, N. Goodarzi, F. Saiedmohammadi, R. Hajiaghaee, M.A. Faramarzi, Z. Tofighi, M.H. Ghahremani // *DARU*. – 2013. – Vol. 21. – P. 51.

165. Karakaya, S. Molecular docking studies of coumarins isolated from extracts and essential oils of *Zosima absinthifolia* Link as potential inhibitors for Alzheimer's disease / S. Karakaya, M. Koca, S.V. Yılmaz, K. Yıldırım, N.M. Pınar, B. Demirci, M. Brestic, O. Sytar // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. - ID 722.

166. Kontogiorgis, C.A. Antiinflammatory and antioxidant evaluation of novel coumarin derivatives / C.A. Kontogiorgis, K. Savvoglu, D.J. Hadjipavlou-Litina // *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 21. – P. 21-29.

167. Majnooni, M.B. Antiangiogenic Effects of Coumarins against Cancer: From Chemistry to Medicine / M. B. Majnooni, S. Fakhri, A. Smeriglio, D. Trombetta, C. R. Croley, P. Bhattacharyya, E. Sobarzo-Sánchez, M. H. Farzaei, A. Bishayee // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – ID 4278.

168. Alipour, M. Antinociceptive properties of new coumarin derivatives bearing substituted 3, 4-dihydro-2 H-benzothiazines / M. Alipour, M. Khoobi, S. Emami, S. Fallah-Benakohal, S.F. Ghasemi-Niri, M. Abdollahi, A. Foroumadi, A. Shafiee // *DARU*. – 2014. – Vol. 22. – P. 9.

169. Bighetti, A. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip / A. Bighetti, M. Antonio, L. Kohn, V. Rehder, M. Foglio, A. Possenti, L. Vilela, J. Carvalho // *Phytomedicine*. – 2005. – Vol. 12. – P. 72-77.

170. Sadraei, H. Antispasmodic effect of osthole and *Prangos ferulacea* extract on rat uterus smooth muscle motility / H. Sadraei, Y. Shokoohinia, S. Sajjadi, B. Ghadirian / *Res. Pharm. Sci.* – 2012. – Vol. 7. – P. 141.

171. Chen, I.-S. Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from Formosan *Peucedanum japonicum* / I.-S. Chen, C.-T. Chang, W.-S. Sheen, C.-M.

Teng, I.-L. Tsai, C.-Y. Duh, F.-N. Ko // *Phytochemistry*. – 1996. – Vol. 41. – P. 525-530.

172. Dongmo, A. Vasodilator effect of the extracts and some coumarins from the stem bark of *Mammea africana* (Guttiferae) / A. Dongmo, A. Azebaze, T. Nguelefack, B. Ouahouo, B. Sontia, M. Meyer, A. Nkengfack, A. Kamanyi, W. Vierling // *J. Ethnopharmacol.* – 2007. – Vol. 111. – P. 329-334.

173. Sakunpak, A. Isolation of new monoterpene coumarins from *Micromelum minutum* leaves and their cytotoxic activity against *Leishmania major* and cancer cells / A. Sakunpak, K. Matsunami, H. Otsuka, P. Panichayupakaranant // *Food Chem.* – 2013. – Vol. 139. – P. 458-463.

174. Musa, M.A. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer / M.A. Musa, J.S. Cooperwood, M.O.F. Khan // *Curr. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 15. – P. 2664-2679.

175. Lake, B.G. Comparison of the hepatotoxicity of coumarin in the rat, mouse, and Syrian hamster: A dose and time response study / B.G. Lake, P. Grasso // *Fundam. Appl. Toxicol.* – 1996. – Vol. 34. – P. 105-117.

176. Siegel, R.L. Cancer statistics, 2019 / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal // *CA. Cancer J. Clin.* – 2019. – Vol. 69. – P. 7-34.

177. Devji, T. Pancreatic anticancer activity of a novel geranylgeranylated coumarin derivative / T. Devji, C. Reddy, C. Woo, S. Awale, S. Kadota, D. Carrico-Moniz // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* – 2011. – Vol. 21. – P. 5770-5773.

178. Amaral, R.; dos Santos, S.; Andrade, L.; Severino, P.; Carvalho, A. Natural Products as Treatment against Cancer: A Historical and Current Vision. *Clin. Oncol.* 2019, 4, 1562.

179. Foroozesh, M. Coumarins and P450s, Studies Reported to-Date / M. Foroozesh, J. Sridhar, N. Goyal, J. Liu // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – Art. ID 1620.

180. Saidu, N.E.B. Coumarin polysulfides inhibit cell growth and induce apoptosis in HCT116 colon cancer cells / N.E.B. Saidu, S. Valente, E. Bana, G. Kirsch, D. Bagrel, M. Montenarh // *Bioorganic Med. Chem.* – 2012. – Vol. 20. – P. 1584-1593.

181. Nordin, N. Pulchrin A, a new natural coumarin derivative of *Enicosanthellum pulchrum*, induces apoptosis in ovarian cancer cells via intrinsic pathway / N. Nordin, M. Fadaeinasab, S. Mohan, N.M. Hashim, R. Othman, H. Karimian, V. Iman, N. Ramli, H.M. Ali, N.A. Majid // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11. – e0154023.

182. Wang, J. Esculetin, a coumarin derivative, exerts in vitro and in vivo antiproliferative activity against hepatocellular carcinoma by initiating a mitochondrial-dependent apoptosis pathway / J. Wang, M. Lu, H. Dai, S. Zhang, H. Wang, N. Wei // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2015. – Vol. 48. – P. 245-253.

183. Haghightalab, A. In vitro investigation of anticancer, cell-cycle-inhibitory, and apoptosis-inducing effects of diversin, a natural prenylated coumarin, on bladder carcinoma cells / A. Haghightalab, M.M. Matin, A.R. Bahrami, M. Iranshahi, M. Saeinasab, F. Z. Haghighi // *Nat. C J. Biosci.* – 2014. – Vol. 69. – P. 99-109.

184. Hejchman, E. Synthesis and anticancer activity of 7-hydroxycoumarinyl gallates / E. Hejchman, P. Taciak, S. Kowalski, D. Maciejewska, A. Czajkowska, J. Borowska, D. Śladowski, I. Młynarczuk-Biały // *Pharm. Rep.* – 2015. – Vol. 67. – P. 236-244.

185. Zahri, S. Antioxidant activity and cytotoxic effect of aviprin and aviprin-3''-O-d-glucopyranoside on LNCaP and HeLa cell lines / S. Zahri, S.M. Razavi, Z. Moatamed // *Nat. Prod. Res.* – 2012. – Vol. 26. – P. 540-547.

186. Chuang, J.-Y. Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria-and caspase-3 dependent mechanism and NF- $\kappa$ B down-regulation / J.-Y. Chuang, Y.-F. Huang, H.-F. Lu, H.-

C. Ho, J.-S. Yang, T.-M. Li, N.-W. Chang, J.-G. Chung // *In Vivo*. – 2007. – Vol. 21. – P. 1003-1009.

187. Aas, Z. Anti-proliferative and apoptotic effects of dendrosomal farnesiferol C on gastric cancer cells / Z. Aas, E. Babaei, M.A.H. Feizi, G. Dehghan // *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* – 2015. – Vol. 16. – P. 5325-5329.

188. Maresca, A. Deciphering the mechanism of carbonic anhydrase inhibition with coumarins and thiocoumarins / A. Maresca, C. Temperini, L. Pochet, B. Masereel, A. Scozzafava, C.T. Supuran // *J. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 53. – P. 335-344.

189. Lv, N. Design and synthesis of 2-phenylpyrimidine coumarin derivatives as anticancer agents / N. Lv, M. Sun, C. Liu, J. Li // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2017. – Vol. 27. – P. 4578-4581.

190. Mokdad-Bzeouich, I. Esculin and its oligomer fractions inhibit adhesion and migration of U87 glioblastoma cells and in vitro angiogenesis / I. Mokdad-Bzeouich, H. Kovacic, K. Ghedira, L. Chebil, M. Ghouli, L. Chekir-Ghedira, J. Luis // *Tumor. Biol.* – 2016. – Vol. 37. – P. 3657-3664.

191. Taniguchi, K. Two new coumarins and a new xanthone from the leaves of *Rhizophora mucronata* / K. Taniguchi, M. Funasaki, A. Kishida, S.K. Sadhu, F. Ahmed, M. Ishibashi, A. Ohsaki // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2018. – Vol. 28. – P. 1063-1066.

192. Mojarrab, M. Cytotoxic Properties of Three Isolated Coumarin-hemiterpene Ether Derivatives from *Artemisia armeniaca* Lam / M. Mojarrab, S.A. Emami, A. Delazar, Z. Tayarani-Najaran // *IJPR*. – 2017. – Vol. 16. – P. 221.

193. Jantamat, P. Cytotoxicity and Apoptosis Induction of Coumarins and Carbazole Alkaloids from *Clausena Harmandiana* / P. Jantamat, N. Weerapreeyakul, P. Puthongking // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – P. 3385.

194. Liu, W. Synthesis and in vitro antitumor activity of novel scopoletin derivatives / W. Liu, J. Hua, J. Zhou, H. Zhang, H. Zhu, Y. Cheng, R. Gust // *Bioorg.*

Med. Chem. Lett. – 2012. – Vol. 22. – P. 5008-5012.

195. Zhang, Y. Convenient synthesis of novel geiparvarin analogs with potential anti-cancer activity via click chemistry / Y. Zhang, Z. Lv, H. Zhong, D. Geng, M. Zhang, T. Zhang, Y. Li, K. Li // Eur. J. Med. Chem. – 2012. – Vol. 53. – P. 356-363

196. Sandhiutami, N.M.D. In vitro assesment of anti-inflammatory activities of coumarin and Indonesian cassia extract in RAW264.7 murine macrophage cell line / N.M.D. Sandhiutami, M. Moordiani, D.R. Laksmiawati, N. Fauziah, M. Maesaroh, W. Widowati // Iran. J. Basic. Med. Sci. – 2017. – Vol. 20. – P. 99.

197. Nishida, N. Angiogenesis in cancer / N. Nishida, H. Yano, T. Nishida, T. Kamura, M. Kojiro // Vasc. Health. Risk Manag. – 2006. – Vol. 2. – P. 213.

198. Cui, N. Triphenylethylene-Coumarin Hybrid TCH-5c Suppresses Tumorigenic Progression in Breast Cancer Mainly Through the Inhibition of Angiogenesis / N. Cui, D.-D. Lin, Y. Shen, J.-G. Shi, B. Wang, M.-Z. Zhao, L. Zheng, H. Chen, J.-H. Shi // Anti-Cancer Agents. Med. Chem. – 2019. – Vol. 19. – P. 1253-1261.

199. Pan, R. Anti-arthritic effect of scopoletin, a coumarin compound occurring in *Erycibe obtusifolia* Benth stems, is associated with decreased angiogenesis in synovium / R. Pan, X.H. Gao, Y. Li, Y.F. Xia, Y. Dai // Fundam. Clin. Pharm. – 2010. – Vol. 24. – P. 477-490.

200. Pan, R. Anti-angiogenic potential of scopoletin is associated with the inhibition of ERK1/2 activation / R. Pan, Y. Dai, J. Yang, Y. Li, X. Yao, Y. Xia // Drug. Dev. Res. – 2009. – Vol. 70. – P. 214-219.

201. Anegundi, N. 7-Hydroxycoumarin Elicit Anti-Angiogenic Effects Through Cellular Apoptosis in Developing Embryos of Zebrafish (*Danio Rerio*) / N. Anegundi, K. Pancharatna // Eur. Sci. J. – 2017. – Vol. 13. – P. 53.

202. Jung, M.H. Decursin and decursinol angelate inhibit VEGF-induced angiogenesis via suppression of the VEGFR-2-signaling pathway / M.H. Jung, S.H.

Lee, E.-M. Ahn, Y.M. Lee // *Carcinogenesis*. – 2009. – Vol. 30. – P. 655-661.

203. Wang, K.S. Imperatorin efficiently blocks TNF- $\alpha$ -mediated activation of ROS/PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway / K.S. Wang, Y. Lv, Z. Wang, J. Ma, C. Mi, X. Li, G.H. Xu, L.X. Piao, S.Z. Zheng, X. Jin // *Oncol. Rep.* – 2017. – Vol. 37. – P. 3397-3404.

204. Bronikowska, J. The coumarin psoralidin enhances anticancer effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) / J. Bronikowska, E. Szliszka, D. Jaworska, Z.P. Czuba, W. Krol // *Molecules*. – 2012. – Vol. 17. – P. 6449-6464.

205. Pan, R. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by scopoletin through interrupting the autophosphorylation of VEGF receptor 2 and its downstream signaling pathways / R. Pan, Y. Dai, X.-H. Gao, D. Lu, Y.-F. Xia // *Vascul. Pharm.* – 2011. – Vol. 54. – P. 18-28.

206. Zhang, J. Anti-cancer and other bioactivities of Korean *Angelica gigas* Nakai (AGN) and its major pyranocoumarin compounds / J. Zhang, L. Li, C. Jiang, C. Xing, S.-H. Kim, J. Lu // *Anticancer. Agents. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 12. – P. 1239-1254.

207. Kim, J.H. Marmesin is a novel angiogenesis inhibitor: Regulatory effect and molecular mechanism on endothelial cell fate and angiogenesis / J.H. Kim, J.K. Kim, E.K. Ahn, H.J. Ko, Y.R. Cho, C.H. Lee, Y.K. Kim, G.U. Bae, J.S. Oh, D.W. Seo // *Cancer Lett.* – 2015. – Vol. 369. – P. 323-330.

208. Yang, Y. Separation and Enrichment of Three Coumarins from *Angelicae Pubescentis Radix* by Macroporous Resin with Preparative HPLC and Evaluation of Their Anti-Inflammatory Activity / Y. Yang, R. Zhu, J. Li, X. Yang, J. He, H. Wang, Y. Chang // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – P. 2664.

209. Cheraghi, O. Potent anti-angiogenic and cytotoxic effect of conferone on human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells / O. Cheraghi, G. Dehghan, M. Mahdavi, R. Rahbarghazi, A. Rezaabakhsh, H.N. Charoudeh, M. Iranshahi, S.

Montazersaheb // *Phytomedicine*. – 2016. – Vol. 23. – P. 398-405.

210. Kumar, A. Daphnetin inhibits TNF- $\alpha$  and VEGF-induced angiogenesis through inhibition of the IKK  $\alpha$ /I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, Src/FAK/ERK 1/2 and Akt signalling pathways / A. Kumar, P. Sunita, S. Jha, S.P. Pattanayak *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* – 2016. – Vol. 43. – P. 939-950.

211. Long, W. Murrangatin suppresses angiogenesis induced by tumor cell-derived media and inhibits AKT activation in zebrafish and endothelial cells / W. Long, M. Wang, X. Luo, G. Huang, J. Chen // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2018. – Vol. 12. – P. 3107-3115.

212. Kim, K.H. Galbanic acid isolated from *Ferula assafoetida* exerts in vivo anti-tumor activity in association with anti-angiogenesis and anti-proliferation / K.H. Kim, H.J. Lee, S.J. Jeong, H.J. Lee, E.O. Lee, H.S. Kim, Y. Zhang, S.Y. Ryu, M.H. Lee, J. Lü // *Pharm. Res.* – 2011. – Vol. 28. – P. 597-609.

213. Alizadeh, M.N. Antitumor effects of umbelliprenin in a mouse model of colorectal cancer / M.N. Alizadeh, M. Rashidi, A. Muhammadnejad, T.M. Zanjani, S.A. Ziai // *Iran. J. Pharm. Res.* – 2018. – Vol. 17. – P. 976-985.

214. Jamialahmadi, K. Auraptene Inhibits Migration and Invasion of Cervical and Ovarian Cancer Cells by Repression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Activity / K. Jamialahmadi, S. Salari, N.S. Alamolhodaei, A. Avan, L. Gholami, G. Karimi // *J. Pharm.* – 2018. – Vol. 21. – P. 177.

215. Pan, R. Scopolin isolated from *Erycibe obtusifolia* Benth stems suppresses adjuvant-induced rat arthritis by inhibiting inflammation and angiogenesis / R. Pan, Y. Dai, X. Gao, Y. Xia // *Int. Immunopharmacol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 859-869.

216. Yao, F. Osthole attenuates angiogenesis in an orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma via the downregulation of nuclear factor- $\kappa$ B and vascular endothelial growth factor / F. Yao, L. Zhang, G. Jiang, M. Liu, G. Liang, Q. Yuan // *Oncol. Lett.* – 2018. – Vol. 16. – P. 4471-4479.

217. El-Sawy, E.R. Synthesis and molecular docking of novel non-cytotoxic anti-angiogenic sulfonyl coumarin derivatives against hepatocellular carcinoma cells in vitro / E.R. El-Sawy, M.S. Ebaid, H.M. Rady, A.B. Shalby, K.M. Ahmed, H.M. Abo-Salem // *J. App. Pharm. Sci.* – 2017. – Vol. 7. – P. 049-066.

218. Lee, S. Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives / S. Lee, K. Sivakumar, W.-S. Shin, F. Xie, Q. Wan // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2006. – Vol. 16. – P. 4596-4599.

219. Neelgundmath, M. Novel synthetic coumarins that targets NF- $\kappa$ B in hepatocellular carcinoma / M. Neelgundmath, K.R. Dinesh, C.D. Mohan, F. Li, X. Dai, K.S. Siveen, S. Paricharak, D.J. Mason, J.E. Fuchs, G. Sethi // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* – 2015. – Vol. 25. – P. 893-897.

220. Lingaraju, G.S. Synthesis of new coumarin tethered isoxazolines as potential anticancer agents / G.S. Lingaraju, K.S. Balaji, S. Jayarama, S.M. Anil, K.R. Kiran, M.P. Sadashiva // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* – 2018. – Vol. 28. – P. 3606-3612.

221. Abdizadeh, T. Design, synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based benzamides as potent histone deacetylase inhibitors and anticancer agents / T. Abdizadeh, M.R. Kalani, K. Abnous, Z. Tayarani-Najaran, B.Z. Khashyarmanesh, R. Abdizadeh, R. Ghodsi, F. Hadizadeh // *Eur. J. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 132. – P. 42-62.

222. Yang, H.Y. Anti-Cancer Activity of an Osthole Derivative, NBM-T-BMX-OS01: Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Signaling and Angiogenesis / H.Y. Yang, Y.F. Hsu, P.T. Chiu, S.J. Ho, C.H. Wang, C.C. Chi, Y.H. Huang, C.F. Lee, Y.S. Li, G. Ou // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8. – e81592.

223. Tabana, Y.M. Scopoletin, an active principle of tree tobacco (*Nicotiana glauca*) inhibits human tumor vascularization in xenograft models and modulates ERK1, VEGF-A, and FGF-2 in computer model / Y.M. Tabana, L.E.A. Hassan, M.B.K. Ahamed, S.S. Dahham, M.A. Iqbal, M.A. Saeed, M.S.S. Khan, D. Sandai,

A.S.A. Majid, C.E. Oon // *Microvasc. Res.* – 2016. – Vol. 107. – P. 17-33.

224. Luo, G. Novel SERMs based on 3-aryl-4-aryloxy-2H-chromen-2-one skeleton-A possible way to dual ER $\alpha$ /VEGFR-2 ligands for treatment of breast cancer / G. Luo, X. Li, G. Zhang, C. Wu, Z. Tang, L. Liu, Q. You, H. Xiang // *Eur. J. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 140. – P. 252-273.

225. Cai, X. Synthesis and biological evaluation of scopoletin derivatives / X. Cai, J. Yang, J. Zhou, W. Lu, C. Hu, Z. Gu, J. Huo, X. Wang, P. Cao // *Bioorganic Med. Chem.* – 2013. – Vol. 21. – P. 84-92.

226. Makowska, A. Hybrid Molecules Composed of 2, 4-Diamino-1, 3, 5-triazines and 2-Imino-Coumarins and Coumarins. Synthesis and Cytotoxic Properties / A. Makowska, F. Sa , czewski, P. Bednarski, J. Sa , czewski, Ł. Balewski // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23. - ID 1616.

227. Дудина, М.О. Антибластомная активность и безопасность 4-алкил-замещенного производного аминохромона: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Марина Олеговна Дудина. – Москва, 2019. – 132 с.

228. Chijiwa, T. Establishment of patient-derived cancer xenografts in immunodeficient NOG mice / T. Chijiwa, K. Kawai, A. Noguchi, H. Sato, A. Hayashi, H. Cho et al. // *Int J Oncol.* – 2015. – Vol. 47. – P. 61-70.

229. Gong, Z. Establishment of a novel bladder cancer xenograft model in humanized immunodeficient mice / Z. Gong, H. Xu, Y. Su, W. Wu, L. Hao, C. Han // *Cell Physiol Biochem.* – 2015. – Vol. 37. – P. 1355-1368.

230. Carbone, L. Pain in laboratory animals: The ethical and regulatory imperatives / L. Carbone // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – e21578.

231. Langford, D.J. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse / D.J. Langford, A.L. Bailey, M.L. Chanda, S.E. Clarke, T.E. Drummond, S. Echols et al. // *Nat Methods.* – 2010. – Vol. 7. – P. 447-449.

232. Girard, P. Nefopam and ketoprofen synergy in rodent models of antinociception / P. Girard, D. Verniers, M.C. Coppé, Y. Pansart, J.M. Gillardin // *Eur J Pharmacol.* – 2008. – Vol. 584. – P. 263-271.

## **ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ**

ВДД – высшая терапевтическая доза

ИГХ – иммуногистохимия

ИФА – иммуноферментный анализ

МДД – минимально-действующая доза

СТД – средне-терапевтическая доза

ТРО – торможение роста опухоли

IC<sub>50</sub> – эффективная подавляющая концентрация

TUBB3 – тубулин-бета 3

## **ПРИЛОЖЕНИЯ**

## Приложение А

Таблица А1 – Индивидуальные значения концентраций АХ-554 в плазме крови экспериментальных животных (кроликов) при однократном внутривенном введении в дозе 5,8 мг/кг

№ животного	Значение концентрации на временной точке, мкг/мл											
	0	0,25	0,5	1	2	3	4	6	8	12	16	24
1	<НПКО	2,9	2,6	2,5	1,8	1,5	1,3	0,4	0,23	0,06	0,03	<НПКО
2	<НПКО	2,5	2,3	2,3	2	1,9	1,6	0,51	0,26	<НПКО	<НПКО	<НПКО
3	<НПКО	2,7	2,4	2,1	1,7	1,6	1,4	0,47	0,22	0,12	0,08	<НПКО
4	<НПКО	2,8	2,5	2,2	2,3	1,5	1,2	0,39	0,18	<НПКО	<НПКО	<НПКО
5	<НПКО	2,8	2,6	2,5	2,4	2,1	1,7	0,57	0,25	0,18	0,03	<НПКО
6	<НПКО	2,9	2,6	2,4	1,9	1,8	1,7	0,38	0,28	0,1	0,02	<НПКО
Mean	-	2,77	2,50	2,33	2,02	1,73	1,48	0,45	0,24	0,08	0,03	-
SD	-	0,06	0,05	0,07	0,11	0,10	0,09	0,03	0,01	0,03	0,01	-
CV, %	-	5,4	5,1	7,0	13,8	13,9	14,4	16,9	14,8	29,3	18,7	-

Таблица А2 – Индивидуальные значения концентраций АХ-554 в плазме крови экспериментальных животных (кроликов) при однократном внутривенном введении в дозе 37,4 мг/кг

№ животного	Значение концентрации на временной точке, мкг/мл											
	0	0,25	0,5	1	2	3	4	6	8	12	16	24
7	<НПКО	17,3	16,7	14,7	10,5	8,3	7,7	2	0,5	0,08	0,05	<НПКО
8	<НПКО	15,9	12,9	11,5	12,8	10,9	9,6	3,7	0,4	0,07	0,07	<НПКО
9	<НПКО	16,7	15,9	13,8	13,1	12,2	11,1	3,6	0,8	0,17	0,04	<НПКО
10	<НПКО	18,4	16,1	15,4	14,6	13,5	11,4	2,9	0,9	0,21	0,03	<НПКО
11	<НПКО	15,3	14,4	12,1	9,9	7,2	5,3	1,6	0,6	0,05	0,03	<НПКО
12	<НПКО	17	15,9	15,3	12,7	11,4	10,3	2,9	0,6	0,11	0,07	<НПКО
Mean	-	16,77	15,32	13,80	12,27	10,58	9,23	2,78	0,63	0,12	0,05	-
SD	-	0,44	0,57	0,68	0,71	0,98	0,95	0,34	0,08	0,03	0,01	-
CV, %	-	6,5	9,18	12,4	12,1	22,5	25,3	13,8	29,4	23,5	37,0	-

Таблица А3 – Индивидуальные значения концентраций АХ-554 в плазме крови экспериментальных животных (кроликов) при однократном внутривенном введении в дозе 104,3 мг/кг

№ животного	Значение концентрации на временной точке, мкг/мл											
	0	0,25	0,5	1	2	3	4	6	8	12	16	24
13	<НПКО	49,4	42,1	38,4	35,8	27,3	20,6	5,5	1,3	0,18	0,12	<НПКО
14	<НПКО	63,8	47,6	43,6	42,6	36,4	28,9	7,5	1,9	0,27	0,21	<НПКО
15	<НПКО	56,5	51,4	48,5	43,5	34,1	30,5	8,1	2,1	0,33	0,15	<НПКО
16	<НПКО	56,5	55,4	44,4	39,9	38,5	35,3	9,2	2,3	0,32	0,1	<НПКО
17	<НПКО	40,6	38,3	34	30,7	28	21,5	6,9	1,6	0,24	0,12	<НПКО
18	<НПКО	55,9	40,5	37,5	32,6	28,1	27,8	7,3	1,8	0,17	0,14	<НПКО
Mean	-	53,78	45,88	41,07	37,52	32,07	27,43	7,42	1,83	0,25	0,14	-
SD	-	3,23	2,74	2,18	2,17	1,99	2,28	0,50	0,15	0,03	0,02	-
CV, %	-	13,8	14,6	13,0	14,2	15,2	20,3	16,6	19,4	27,8	14,2	-

Таблица А4 – Индивидуальные значения концентраций АХ-554 в плазме крови экспериментальных животных (кроликов) при однократном внутрижелудочном введении в дозе 5,8 мг/кг

№ животного	Значение концентрации на временной точке, мкг/мл											
	0	0,25	0,5	1	2	3	4	6	8	12	16	24
19	<НПКО	0,4	1,4	2,2	2,4	2,2	1,8	1,2	0,45	0,11	0,05	<НПКО
20	<НПКО	0,3	1,2	1,8	2,3	2,1	1,5	1	0,28	0,1	<НПКО	<НПКО
21	<НПКО	0,4	1,6	2,4	2,7	2,4	2,3	1,7	0,57	0,14	0,08	<НПКО
22	<НПКО	0,5	1,5	2,3	2,5	2,5	2,2	1,8	0,61	0,13	0,09	<НПКО
23	<НПКО	0,4	1,4	1,9	2,4	1,8	1,5	1,3	0,39	0,1	0,06	<НПКО
24	<НПКО	0,4	1,5	2	2,5	2,3	1,7	1,1	0,48	0,13	<НПКО	<НПКО
Mean	-	0,40	1,43	2,10	2,47	2,22	1,83	1,35	0,46	0,12	0,06	-
SD	-	0,03	0,06	0,10	0,06	0,10	0,2	0,13	0,05	0,01	0,01	-
CV, %	-	15,8	9,5	11,3	5,5	11,2	18,8	24,2	25,9	14,6	27,6	-

Таблица А5 – Индивидуальные значения концентраций АХ-554 в плазме крови экспериментальных животных (кроликов) при однократном внутрижелудочном введении в дозе 37,4 мг/кг

№ животного	Значение концентрации на временной точке, мкг/мл											
	0	0,25	0,5	1	2	3	4	6	8	12	16	24
25	<НПКО	2	8,2	12,1	13,4	13	8,7	6,3	2,34	0,54	<НПКО	<НПКО
26	<НПКО	2,2	7,9	10,6	14,6	11,6	11,7	8,4	3,15	0,72	0,36	<НПКО
27	<НПКО	2,4	8,9	15,2	15,7	14	13,3	7,5	2,17	0,83	0,41	<НПКО
28	<НПКО	2,3	8,6	14,7	13,4	13,3	11,8	9,6	3,5	0,63	0,3	<НПКО
29	<НПКО	2,4	7,6	10,5	13,7	13,3	9,9	5,8	2,1	0,47	0,24	<НПКО
30	<НПКО	2,3	8,4	12,9	11,6	13,4	11,3	7,7	2,77	0,77	0,35	<НПКО
Mean	-	2,27	8,27	12,67	13,73	13,10	11,12	7,55	2,67	0,66	0,32	-
SD	-	0,06	0,19	0,81	0,56	0,33	0,66	0,56	0,23	0,06	0,03	-
CV, %	-	6,6	5,7	15,7	9,9	6,1	14,5	18,3	21,2	20,9	21,0	-

Таблица А6 – Индивидуальные значения концентраций АХ-554 в плазме крови экспериментальных животных (кроликов) при однократном внутрижелудочном введении в дозе 104,3 мг/кг

№ животного	Значение концентрации на временной точке, мкг/мл											
	0	0,25	0,5	1	2	3	4	6	8	12	16	24
31	<НПКО	6,6	23,5	35,4	50,8	41,7	32,7	20,5	7,1	1,6	0,8	<НПКО
32	<НПКО	6,8	24,9	37,6	53,6	44,9	29,8	19,7	6,9	1,2	0,5	<НПКО
33	<НПКО	7,3	26,3	40,4	55,8	45,8	36,4	24,3	8,3	2,4	1,2	<НПКО
34	<НПКО	6,7	24,1	34,6	44,6	39,4	35,7	25,7	9,2	2,7	1,4	<НПКО
35	<НПКО	5,9	22,6	33,8	50,7	43,6	33,8	21,7	7,6	1,8	0,9	<НПКО
36	<НПКО	6,9	25,6	37,9	51,4	41,7	33,3	19,4	7,8	1,9	1,8	<НПКО
Mean	-	6,70	24,50	36,62	51,15	42,85	33,62	21,88	7,82	1,93	1,10	-
SD	-	0,19	0,56	1,01	1,54	0,97	0,96	1,05	0,34	0,22	0,19	-
CV, %	-	6,9	5,6	6,7	7,3	5,5	6,9	11,8	10,8	28,8	29,0	-