

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПО
ИЗЫСКАНИЮ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ ИМЕНИ Г.Ф.ГАУЗЕ»

На правах рукописи

Трещалин Михаил Иванович

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО
МУЛЬТИТАРГЕТНОГО ПРЕПАРАТА АНТРАФУРАН

Специальность 14.03.07 – химиотерапия и антибиотики

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Переверзева Э.Р.

Москва, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Современное состояние и проблемы противоопухолевой химиотерапии	12
1.2. Таргетные препараты в онкологии	14
1.2.1. Мишени таргетной терапии	14
1.2.2. Иммунологическая составляющая механизма действия таргетных препаратов	16
1.2.3. Эффективность таргетной терапии	17
1.2.4. Токсичность таргетных препаратов	18
1.2.5. Проблемы и перспективы таргетной терапии	19
1.2.6. Комбинированное применение таргетных препаратов	19
1.2.7. Комбинированное применение таргетных препаратов и классических противоопухолевых агентов	20
1.2.8. Новые цитостатики в лечении злокачественных опухолей	21
1.3. Топоизомеразы – мишени цитостатической терапии	23
1.3.1. Классификация и механизм действия	23
1.3.2. Клеточные функции топоизомераз.....	25
1.3.3. Механизмы блокирования топоизомеразы типа I.....	26
1.3.4. Поиск новых некамптотециновых ингибиторов топоизомераз	26
1.3.5. Ингибиторы топоизомеразы II.....	30
1.4. Антрациклины и антрацендионы – ингибиторы топоизомераз	31
1.4.1. Антрациклиновые антибиотики	31
1.4.2. Механизм действия антрациклиновых антибиотиков	33
1.4.3. Поиск аналогов антрациклинов с улучшенными свойствами	34
1.4.4. Роль топоизомераз в развитии и преодолении кардиотоксичности антрациклинов	36
1.4.5. Антрацендионы	38
Заключение	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1. Лабораторные животные	43
2.2. Опухолевые модели	44
2.3. Образцы препарата для исследований.....	45
2.4. Оценка эффективности антрафурана.....	45
2.5. Оценка переносимости антрафурана	47
2.5.1. Исследование острой токсичности	47
2.5.2. Исследование субхронической токсичности.....	48
2.5.3. Дизайн субхронических экспериментов	49
2.5.4. Статистическая обработка экспериментальных данных	50
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	52

ГЛАВА 3. Изучение эффективности и безопасности антрафурана при парентеральном введении	52
3.1. Внутривенное введение	52
3.1.1. Оценка эффективности субстанции и лекарственной формы антрафурана	52
3.1.2. Оценка острой токсичности субстанции и лекарственной формы антрафурана на мышах	53
3.1.3. Оценка острой токсичности антрафурана на крысах	56
3.2. Внутривенное введение	57
3.2.1. Оценка острой токсичности субстанции антрафурана на мышах BDF ₁	57
3.2.2. Оценка острой токсичности лекарственной формы антрафурана на крысах самцах Wistar	59
3.2.3. Оценка эффективности субстанции антрафурана	60
3.3. Заключение	60
ГЛАВА 4. Изучение эффективности и безопасности антрафурана при пероральном введении ..	62
4.1. Эффективность антрафурана на скрининговых опухолевых моделях	62
4.1.1. Лимфолейкоз P388	62
4.1.2. Эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC)	66
4.2. Эффективность антрафурана на модели рака молочной железы человека T47D при пероральном применении	68
4.2.1. Эффективность субстанции	69
4.2.2. Эффективность лекарственной формы	71
4.3. Острая токсичность лекарственной формы при пероральном введении	72
4.3.1. Острая токсичность антрафурана на мышах	72
4.3.2. Острая токсичность антрафурана на крысах	73
ГЛАВА 5. Изучение особенностей повреждающего действия антрафурана при длительном пероральном применении	76
5.1. Субхроническая токсичность антрафурана на крысах при пероральном применении	76
5.1.1. Клинические и лабораторные показатели	76
5.1.2. Патоморфологическое исследование	83
5.2. Субхроническая токсичность антрафурана на кроликах при пероральном применении	91
5.2.1. Клинические и лабораторные показатели	91
5.2.2. Патоморфологическое исследование	95
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ	115
СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	117
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (ТАБЛИЦЫ)	136
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (РИСУНКИ)	138
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (МИКРОФОТОГРАФИИ)	140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В последние десятилетия возможности лечения злокачественных опухолей значительно расширились. Существенно пополнился арсенал противоопухолевых лекарств [Переводчикова и др., 2013, Горбунова, 2013]. Наряду с классическими противоопухолевыми препаратами в клинической практике стали широко использовать биотерапевтические средства, направленные на определенные молекулярные мишени, позволяющие контролировать рост опухолей [Новик, 2018]. Применение таких молекулярно-нацеленных или «таргетных» препаратов привело к изменению структуры смертности от онкологических заболеваний, уменьшению удельного веса локализаций с высоким уровнем летальности (рак пищевода, желудка, колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого и др.) и увеличению медианы выживаемости больных [Мерабишвили, 2019, Каприн и др., 2018].

Однако, даже высокоизбирательное воздействие на опухоль таких таргетных препаратов, как моноклональные антитела, может вызывать нежелательные явления [Новик, 2018]. Трудность их контроля, как правило, определяется независимостью от дозы иммунотерапевтического средства. В таких случаях требуется изменение лечебной тактики и возврат к классической химиотерапии [Давыдов и др., 2017]. Часть биологических агентов обладает способностью потенцировать противоопухолевую активность химиотерапевтических веществ, но достижение максимально возможного лечебного эффекта от комбинированного воздействия нередко ограничивается токсическими свойствами цитостатиков.

Прорывные успехи в совершенствовании методов органической и медицинской химии, наряду с установлением молекулярных мишеней ингибирования опухолевого роста, сыграли существенную роль в развитии противоопухолевой химиотерапии. Они позволили направленно синтезировать практически любые вещества, и открыли возможность разработки новых поколений противоопухолевых препаратов с улучшенными терапевтическими

свойствами [Давыдов и др., 2017]. В настоящее время многими исследователями проводятся различные химические модификации высокоэффективных препаратов с целью снижения токсичности и обхода лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Появляются новые поколения антрациклиновых антибиотиков и их синтетических аналогов - антрацендионов, применяемых во многих схемах химиотерапии. Так, в ФГБНУ «НИИНА» в результате направленного поиска противоопухолевых веществ в ряду гетероаренантрацендионов было синтезировано производное антра[2,3-*b*]фуран-3-карбоксамид (антрафуран), способное подавлять рост опухолевых клеток различного гистогенеза, включая линии с множественной лекарственной устойчивостью [Shchekotikhin et al., 2016, Tikhomirov et al., 2018, Volodina et al., 2019]. Исследования показали, что Антрафуран обладает способностью к одновременному ингибированию нескольких мишеней, важных для опухолевого роста - топоизомераз I и II, а также ряда серин-треониновых протеинкиназ, включая AurB, AurC, Pim1, Pim3, т.е. оказывает мультитаргетное действие на опухолевые клетки. Соединение продемонстрировало значимую терапевтическую эффективность *in vivo* как при парентеральном, так и при пероральном пути введения [Shchekotikhin et al., 2016].

В настоящее время около 30% противоопухолевых препаратов применяют перорально, включая многие биотерапевтические средства [Гилман и др., 2006], алкилирующие агенты, противоопухолевые антибиотики. Этот путь введения улучшает качество жизни больных и позволяет сократить время их пребывания в клинике [Decision Resources Survey, 2005].

Учитывая тенденции развития современной противоопухолевой химиотерапии, представляется чрезвычайно актуальной разработка мультитаргетного противоопухолевого препарата для перорального применения, обладающего способностью преодолевать лекарственную устойчивость опухолевых клеток.

Степень разработанности. К настоящему времени накоплено достаточно много данных относительно изучения новых антрациклинов и антрацендионов с

улучшенными терапевтическими свойствами. В предклинических и клинических исследованиях оценивается следующее поколение препаратов этого класса [Nadas et al., 2006, Arcamone, 2008, Yamamoto et al., 2009, Cookson et al., 2014, Marczak et al., 2015]. Поскольку в качестве терапевтических мишеней этих антибиотиков признаны топоизомеразы человека I и II и две их изоформы hTop1 и hTop2, то изучено большое количество ингибиторов различных изоформ этих ферментов. Большинство их находится в стадии разработки [Vicker et al., 2002, Amin et al., 2018].

В доступной литературе отсутствуют данные о получении и изучении субстанций и лекарственных форм мультитаргетных антрацендионов, обладающих высокой противоопухолевой активностью, а также отсутствуют зарегистрированные лекарственные средства для перорального применения, содержащие в качестве действующего вещества субстанцию антрацендиона, за исключением митоксантрона – синтетического цитостатического препарата, ингибитора топоизомеразы II.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы явилось фармакологическое изучение субстанции и лекарственной формы метансульфоната (S)-3-[(3-амино-1-пирролидинил)карбонил]-4,11-дигидрокси-2-метилантра[2,3-b]фуран-5,10-диона (антрафуран, ЛХТА-2034).

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительную оценку противоопухолевой активности и параметров острой токсичности антрафурана при различных путях введения;
2. В исследовании на моделях опухолей мышей и человека изучить основные терапевтические характеристики эффективности и переносимости антрафурана в пероральной лекарственной форме;
3. Изучить субхроническую токсичность субстанции антрафурана при пероральном пути введения;

4. Определить токсикологические характеристики антрафурана в лекарственной форме при пероральном применении.

Научная новизна. Впервые получены данные об эффективности и безопасности антрафурана – оригинального препарата нового класса противоопухолевых средств, созданного на основе антра[2,3-b]фуран-3-карбоксамиды.

Впервые экспериментально доказано, что антрафуран – синтетический аналог классических цитотоксических антрациклиновых антибиотиков – при наличии полифармакологического (мультитаргетного) механизма действия не имеет лимитирующих видов токсичности.

Впервые установлена зависимость эффективности и переносимости антрафурана от пути введения.

Впервые при различных путях введения определен диапазон переносимых и токсических доз антрафурана, установлены причины гибели животных при передозировках.

Впервые на различных моделях перевиваемых опухолей мышей и человека установлен диапазон терапевтических доз и режим введения лекарственной формы антрафурана для перорального применения.

Впервые при изучении субхронической токсичности субстанции и лекарственной формы антрафурана определен спектр функциональных и морфологических изменений органов и тканей, установлена их зависимость от дозы и обратимость токсического действия.

Впервые выявлена способность антрафурана к преодолению гематоэнцефалического барьера.

Научное значение проведенного исследования состоит в демонстрации возможности создания синтетических аналогов антрациклина с высокой терапевтической эффективностью, основанной на мультитаргетном механизме действия, и удовлетворительной переносимостью, улучшенной по сравнению с антрациклиновыми антибиотиками.

Параметры фармакодинамических эффектов антрафурана, полученные на адекватных опухолевых моделях, представляют собой основу для разработки и оптимизации лекарственных средств на основе антрахинонов.

Результаты проведенного исследования позволят уточнить стратегию последующего доклинического и клинического исследования препаратов близкой структуры и механизма действия.

Практическая значимость работы. Завершено предклиническое изучение препарата антрафуран в качестве противоопухолевого средства для перорального применения. Установлены особенности его побочного действия. Определены вероятные токсические реакции при передозировках. Полученные терапевтические и токсикологические характеристики антрафурана будут востребованы при формировании программы клинических испытаний.

Высокая противоопухолевая активность антрафурана при внутрибрюшинном пути введения указывает на возможность его применения для региональной химиотерапии при первичных опухолях брюшины (мезотелиомы, псевдомиксомы), а также при перитонеальном карциноматозе, обусловленном метастазированием колоректального рака, рака яичников, аппендикса, карциномы поджелудочной железы, желудка.

Проникновение препарата через гематоэнцефалический барьер при пероральном введении открывает перспективу его использования для лечения опухолей мозга.

Методы исследования. В работе использованы стандартные токсикологические, гематологические, биохимические, патоморфологические методы исследования. Противоопухолевая активность субстанции и лекарственной формы антрафурана оценивалась с применением методов экспериментальной онкологии на моделях перевиваемых опухолей мышей и ксенографтах опухолей человека.

Положения, выносимые на защиту

1. Количественные показатели острой токсичности и механизм гибели животных существенным образом зависят от пути введения антрафурана. Многократное снижение параметров острой токсичности антрафурана при пероральном введении создает возможность для поиска оптимальных эффективных доз и режимов применения препарата.

2. Антрафуран высоко эффективен при многократном пероральном введении в широком диапазоне доз. Схема с ежедневным 5-кратным курсом и разовой дозой 80 мг/кг является оптимальной по кратности и длительности введения иммунокомпетентным мышам с перевиваемыми опухолями.

3. Антрафуран, примененный в пероральной лекарственной форме, достоверно и значимо ингибирует рост подкожно привитых ксенографтов рака молочной железы человека T47D на уровне T/C=38–42% в режиме 5-кратного введения с интервалом 48 часов в разовой дозе 80 мг/кг, близкой к МПД для мышей Balb/c nude.

4. Функциональные и морфологические изменения, возникающие под действием антрафурана, зависят от величины примененной дозы. При курсовом введении препарата в дозе, эквивалентной 1 терапевтической, они полностью обратимы в течение 30 дней.

5. Особенностью токсического действия антрафурана является его способность проникать через гематоэнцефалический барьер. Она проявляется морфологически только при многократном использовании высокой дозы соединения.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.03.07 – Химиотерапия и антибиотики, а именно пункту 7 «Изучение токсикологических, фармакологических, фармакокинетических и фармакодинамических свойств, иммуномодулирующего действия химиотерапевтических препаратов в эксперименте».

Личный вклад автора. Автором был проведен обзор актуальной литературы, составлен план исследований, проведена основная часть экспериментальных работ, представленных в диссертации, проанализированы полученные результаты и подготовлены материалы для публикации. Постановка экспериментов на моделях перевиваемых опухолей мышей и ксенографтах опухолей человека осуществлялась в сотрудничестве с НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обоснована использованием достаточного количества животных в экспериментальных группах, выбором адекватных контролей, использованием современных методов исследований и оборудования, а также статистической обработкой данных.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях: XV Всероссийской научно-практической конференции имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы» (Москва, 2018 г.), XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2017 г.), XXXVIII Международной научно-практической конференции EurasiaScience, XXXVIII Международной научно-практической конференции Advances in science and technology.

Результаты работы были включены в Патент РФ №2639479 «Пероральные противоопухолевые средства и способ лечения онкологических заболеваний», а также в Отчет о выполнении проекта «Разработка экспериментального образца пероральной лекарственной формы оригинального мультитаргетного противоопухолевого антрафурандиона», выполненного в рамках Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».

Апробация диссертации была проведена на Ученом совете ФГБНУ «НИИНА», протокол № 7 от 07 декабря 2021 года

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 9 статей, из них 5 - в изданиях, индексируемых в базах данных Scopus/Web of Science, и 4 - в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 4 тезисов в сборниках.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 141 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 22 таблицами, 20 рисунками и 34 микрофотографиями. Список использованной литературы включает 165 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современное состояние и проблемы противоопухолевой химиотерапии

Введение

Злокачественные новообразования – группа нозологических форм, наиболее сложно поддающихся всем известным методам лечения. Тем не менее, за последние 70 лет структура онкопатологии существенно изменилась в лучшую сторону. Значительно уменьшился удельный вес локализаций с высоким уровнем летальности (рак пищевода, желудка, легких и др.) и увеличился удельный вес локализаций с низкой летальностью (рак молочной железы, предстательной железы, меланома кожи и др.). [1, 2]. Во многом это связано с тем, что в последние десятилетия возможности лечения злокачественных опухолей значительно расширились, главным образом, за счет развития фармакотерапии, которая в современной онкологии является одним из основных методов лечения [3].

В лекарственной терапии опухоли различали два основных направления:

– противоопухолевая химиотерапия, т.е. применение в лечебных целях синтетических химических соединений, веществ, полученных биотехнологическими методами, а также веществ, выделенных из природных источников, действие которых направлено непосредственно на опухолевую клетку;

– эндокринная терапия, имеющая конечной целью также воздействие на опухолевую клетку, но осуществляющая это путем влияния на механизмы гормональной регуляции опухолевого роста [3].

В конце 20 века стало бурно развиваться еще одно направление - биотерапия – применение лекарственных средств, активность которых обусловлена веществом, полученным из биологического источника с использованием живых организмов, например, клеточных линий, и с применением различных биотехнологических методов (технологии

рекомбинантной ДНК, контролируемой экспрессии генов, кодирующих выработку биологически активных белков, методов получения моноклональных антител). В его основу легли результаты молекулярно-биологических исследований механизмов возникновения и развития злокачественных опухолей, создавших фундамент для разработки новых принципов и подходов к лечению рака и для разработки новых препаратов. Совершенствование органической и медицинской химии и развитие биотехнологических методов создания лекарственных средств позволило направленно получать практически любые вещества с заданными свойствами.

В химиотерапии злокачественных опухолей произошли существенные изменения. Значительно расширилась классификация противоопухолевых агентов; появились новые противоопухолевые лекарства, направленные на молекулярные и генетические мишени опухолевого роста; внедрены средства биотерапии (моноклональные антитела, ингибиторы металлопротеиназ, киназ, ангиогенеза, дифференцирующие агенты и др.) [4]. Химиотерапия стала более широко использоваться при ранних стадиях заболевания – расширились показания для неoadьювантной химиотерапии, совершенствуются режимы адьювантной химиотерапии.

Многочисленные экспериментальные и клинические исследования подтвердили, что для выбора оптимальной тактики лечения на разных стадиях болезни необходимо определение молекулярно-генетического профиля опухоли. Для определения чувствительности к конкретному препарату стало обязательным предварительное определение наличия или активации мишеней опухолевого роста [5]. Таким образом, сегодня приоритетным направлением в онкологии стала таргетная терапия, которая, в отличие от классического воздействия цитостатиками, представляет собой целенаправленное лечение.

1.2. Таргетные препараты в онкологии

1.2.1. Мишени таргетной терапии

Концепция «мишени» была сформулирована в начале прошлого века немецким учёным Паулем Эрлихом (Paul Ehrlich). Мишень – это фермент (либо другая биологическая молекула, органелла, физиологическая особенность и т.д.), который присутствует в патогене и необходим для жизнеспособности последнего, но при этом отсутствует в организме пациента. Лекарственные препараты, обладающие способностью специфически ингибировать молекулы-мишени, должны характеризоваться исключительно широким терапевтическим индексом, а именно демонстрировать высокую активность при минимуме побочных эффектов [6]. Фундаментальным достижением последних десятилетий является формирование нового класса «таргетных, молекулярно-ориентированных препаратов», создаваемых для воздействия на определенные, заранее установленные внутриклеточные молекулярные мишени, имеющие ключевое значение для жизнедеятельности опухолевой клетки [7].

Сегодня таргетная терапия рассматривается как приоритетное направление в лечении онкологических заболеваний. В отличие от классических цитотоксических препаратов, средства для таргетной терапии воздействуют на определенные мишени в клетках опухоли. Действие традиционных химиотерапевтических средств (алкилирующих агентов, антиметаболитов, антибиотиков, винка-алколоидов, таксанов, ингибиторов топоизомераз) также имеет специфическую направленность, но принципиально отличается от эффектов таргетных препаратов тем, что точкой приложения цитостатиков являются общебиологические процессы, такие как синтез ДНК и митоз [8].

Мишенями таргетных препаратов служат факторы роста и их рецепторы, в первую очередь – рецепторы эпидермального фактора роста (EGF) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), белки, осуществляющие проведение митогенных сигналов от рецепторных молекул, нерцепторные тирозинкиназы, белки

семейства Ras, циклинзависимые киназы, молекулы, контролирующие апоптоз (Bcl2, p53 и др.) и ангиогенез.

По своей природе таргетные препараты относятся к различным соединениям. Это - моноклональные антитела к факторам роста и их рецепторам; нерцепторные моноклональные антитела и их конъюгаты; малые синтетические молекулы – ингибиторы протеинкиназ; короткие синтетические отрезки ДНК, связывающиеся с мРНК – антисмысловые нуклеотиды; вирусы. Наиболее широко используются моноклональные антитела (МКА) – ингибиторы протеинкиназ, которые стали первыми препаратами таргетной терапии [8].

Таргетные препараты могут быть нацелены на пути передачи сигнала в опухолевой клетке либо на уникальный фенотип опухолевой клетки. Основной принцип действия таргетных препаратов, блокирующих передачу сигнала, базируется на том, что они прерывают взаимодействие лигандов (молекул гормонов, цитокинов, факторов роста и др.) с рецепторами клетки, передающими сигнал к ядру, который определяет способность клетки к пролиферации, дифференцировке, апоптозу, адгезии, ангиогенезу. На принципе блокирования передачи митогенных и антиапоптотических сигналов основано действие препаратов, имеющих своей мишенью рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR). К препаратам, нацеленным на фенотип опухолевой клетки, относятся моноклональные антитела (МКА), распознающие и блокирующие специфические нерцепторные антигены поверхности клеток и оказывающие на них прямое цитотоксическое действие. В качестве примера можно привести гуманизированное мышиное антитело к поверхностному антигену CD20 В-клеток (Мабтера), с успехом используемое при В-клеточных неходжкинских лимфомах и хроническом лимфолейкозе.

Стратегически таргетная терапия может быть нацелена на различные звенья системы передачи сигнала, включая блокаду циркулирующих лигандов, блокаду связывания лигандов с экстрацеллюлярным доменом рецептора; ингибирование тирозинкиназ внутриклеточного домена рецептора, приводящее к блокаде

фосфорилирования, нарушающего передачу сигнала от рецептора к молекулам, передающим сигнал внутри клетки; внутриклеточное ингибирование белков, осуществляющих интрацеллюлярную передачу сигнала.

Сформулированы классы мишеней для воздействия таргетных противоопухолевых препаратов. Среди них:

1) рецепторы к эпидермальным факторам роста (EGFR) и факторам роста сосудов – VEGF (рецепторы ангиогенеза – VEGFR);

2) белки, осуществляющие проведение митогенных сигналов от рецепторных молекул;

3) молекулы, контролирующие запуск и течение программированной смерти клеток;

4) гены, отвечающих за рост и деление раковых клеток;

5) перспективная новая технология направлена на «выключение» (сайленсинг, от англ. silence – молчание) генов на основе механизма РНКинтерференции (механизма ингибирования экспрессии гена на стадии трансляции с помощью малых интерферирующих РНК).

1.2.2. Иммунологическая составляющая механизма действия таргетных препаратов

Важную часть противоопухолевой активности таргетных препаратов составляет иммунологический механизм действия [9]. Это основывается как на форме самих препаратов (моноклональные антитела), так и на известных иммунокорректирующих влияниях этой группы лекарственных средств. Так, антиангиогенная терапия, включающая VEGF, может рассматриваться как иммунотерапия, т.к. VEGF является одним из важных иммуносупрессивных факторов, влияющих на эффективность противоопухолевого иммунного ответа [10]. Изучение многих ингибиторов тирозинкиназ (например, ингибиторов BRAF) показало, что именно иммунологический компонент действия обеспечивает поддержание длительных эффектов терапии данными препаратами [11]. Наступление резистентности к такому лечению в значительной степени

обусловлено потерей контроля над клетками иммунной системы и над продукцией противовоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-8 (ИЛ-8), в опухолевом микроокружении [12, 13].

1.2.3. Эффективность таргетной терапии

В настоящее время практически для всех солидных опухолей и гемобластозов разработаны и введены в клиническую практику таргетные лекарства. Так, для лечения почечно-клеточного рака на протяжении небольшого периода времени появилось 7 таргетных препаратов, для лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) зарегистрировано 4 таргетных препарата, рака толстой и прямой кишки – 5, рака молочной железы – 5, желудка – 1, сарком мягких тканей – 1, рака яичников – 1, гепатоцеллюлярного рака – 1. Давно и успешно используется ингибитор c-kit иматиниб (Гливек), позволивший добиться почти трехкратного улучшения выживаемости больных с метастазами при гастроинтестинальных стромальных опухолях (ГиСО). Эффективность гливека составляет 70–80%. В качестве второй линии лечения ГиСО недавно зарегистрирован еще один таргетный препарат – сунитиниб (Сутент), представляющий собой мультитаргетный препарат, действующий, в том числе и как антиангиогенный ингибитор [14].

Гливек назначают и в качестве адъювантной терапии после радикальных операций. Для лечения высоко злокачественной диссеминированной меланомы с мутацией BRAF совсем недавно было зарегистрировано еще два новых препарата. Для лечения нейроэндокринных опухолей (НЭО) желудка зарегистрирован эверолимус (Афинитор), а для НЭО поджелудочной железы – сунитиниб (Сутент). Даже для такой до сих пор малочувствительной опухоли, как медуллярный рак щитовидной железы, недавно зарегистрирован препарат вандетаниб (Капрелса), дающий эффект у 45% больных.

Таким образом, благодаря таргетной терапии стало возможным лекарственное лечение целого ряда злокачественных опухолей, ранее

считавшихся инкурабельными. Улучшены контроль симптомов и качество жизни пациентов. Хотя заболевания остаются неизлечимыми, однако с помощью современных подходов удалось увеличить медиану выживаемости больных. По мере развития этого направления появляются не только новые препараты, но и открываются новые показания к их использованию, разрабатываются схемы их применения, исследуются новые сочетания и режимы комбинированной таргетной терапии. Все это позволяет надеяться на существенное расширение возможностей лечения злокачественных опухолей в ближайшем будущем [14].

1.2.4. Токсичность таргетных препаратов

Токсичность таргетных препаратов отличается от токсичности большинства классических цитостатиков. При меньшем угнетающем действии на кроветворение эти препараты чаще вызывают кожные сыпи, диарею, аллергические реакции, нарушение общего состояния, усталость. Препараты, имеющие своей мишенью рецепторы эпидермального фактора роста (эрлотиниб, gefитиниб, цетуксимаб) вызывают характерные кожные изменения, что нередко положительно коррелирует с эффективностью этих препаратов. При клинических испытаниях антиангиогенных препаратов лимитирующей токсичностью оказались гемorragии и артериальная гипертензия, тромбоэмболические осложнения.

Токсичность каждого таргетного препарата имеет свои особенности. Так, трастузумаб обладает кардиотоксичностью, что ограничивает возможности его комбинации с антрациклинами, а при использовании бевацизумаба описано редкое, но опасное осложнение – гастроинтестинальные перфорации.

Противоопухолевая активность и переносимость таргетных препаратов изучаются в процессе клинических испытаний, методика которых принципиально отличается от традиционной методики клинических испытаний классических цитостатиков [8].

1.2.5. Проблемы и перспективы таргетной терапии

Большинство таргетных препаратов оказывает ингибирующее влияние на пролиферацию и/или стимулирует дифференцировку опухолевых клеток за счет выключения механизмов, отвечающих за формирование злокачественного фенотипа, поэтому основным эффектом при их использовании является не излечение, а длительное сдерживание опухолевого роста или уменьшение опухолевой массы. Это не умаляет их значимости, т. к. перевод злокачественной опухоли в состояние хронического заболевания, является не менее привлекательной целью, чем достижение полного излечения [7].

По мере расширения клинических исследований таргетных препаратов появляется все больше данных, указывающих на быстрое развитие к ним резистентности, которое объясняется выраженной генетической нестабильностью опухолевых клеток, позволяющей им ускользать от ингибирующего действия мишень-направленных лекарственных средств. Все большее распространение получает мнение, что во многих случаях монотерапия таргетными препаратами в принципе не может привести к излечению от рака [15].

Препятствием эффективного применения таргетной терапии являются обширные связи между сигнальными путями, что позволяет части опухолевых клеток использовать другие пролиферативные сигналы, и возникающие мутации в рецепторах, которые могут приводить к потере чувствительности опухолевой клетки к ингибитору сигнальной трансдукции [7]. Разработка мультитаргетных препаратов или сочетанного применения нескольких таргетных препаратов позволила бы подойти к решению проблемы преодоления этой особенности злокачественного роста.

1.2.6. Комбинированное применение таргетных препаратов

Возможность повышения противоопухолевого эффекта при последовательном или одномоментном применении двух и более таргетных препаратов - ингибиторов различных ферментов одного пути передачи сигнала -

получила подтверждение в доклинических и клинических исследованиях [16]. Однако в клинике возникла проблема их переносимости. Так, при почечноклеточном раке противоопухолевой активностью обладают ингибитор VEGF бевацизумаб, ингибиторы тирозинкиназ рецепторов VEGF сорафениб и сунитиниб, а также ингибитор m-TOR – темзиролимус. Вертикальная блокада оси VEGF→VEGFR комбинацией бевацизумаба с сорафенибом обладает, по данным I фазы клинического изучения, выраженным противоопухолевым эффектом (общая эффективность 46%), однако существенное повышение токсичности (ладонно-подошвенный синдром, гипертензия, протеинурия) требует значительной редукции доз этих препаратов. Комбинации сорафениба или сунитиниба с темзиролимусом оказались непереносимыми. Комбинация бевацизумаба с темзиролимусом оказалась хорошо переносимой, а комбинация бевацизумаб + сунитиниб осложнилась синдромом тромботической тромбоцитопенической пурпуры [17]. Таким образом, принцип комбинации различных таргетных препаратов несомненно привлекателен, но каждая комбинация требует специального изучения в виде I фазы клинических испытаний для отработки оптимального дозового режима [18].

Опыт применения данного класса противоопухолевых лекарств также показал, что дальнейшее улучшение результатов лечения возможно при условии индивидуального подхода к выбору терапии, использования новых таргетных препаратов, в том числе, направленных на молекулярные мишени фракций стволовых опухолевых клеток, а также более широкому включению в арсенал противоопухолевой химиотерапии комбинаций таргетных препаратов с цитостатиками.

1.2.7. Комбинированное применение таргетных препаратов и классических противоопухолевых агентов

Как было отмечено выше, изучение эффективности и безопасности сочетаний препаратов таргетной и цитотоксической терапии представляется перспективным направлением [19]

Большинство современных таргетных препаратов оказывают наиболее выраженный противоопухолевый эффект в составе лекарственных комбинаций с классическими противоопухолевыми препаратами. В этой связи особое значение приобретают крупные многоцентровые рандомизированные исследования, позволяющие наиболее точно оценить эффективность и переносимость новых терапевтических режимов [20]. В рамках подобных исследований были разработаны режимы комбинированной химиотерапии рака молочной железы с использованием трастузумаба в сочетании с таксанами, алкилирующими агентами, капецитабином, навельбином, гемцитабином. Хотя противоопухолевая активность комбинации была высокой, опасная кардиотоксичность одномоментного применения трастузумаба и антрациклинов не позволила рекомендовать это сочетание в практику.

Таргетная терапия (лапатиниб и/или трастузумаб) в сочетании с химиотерапией (капецитабин) обладает высокой эффективностью при метастатическом поражении головного мозга у больных раком молочной железы с гиперэкспрессией Her-2/neu. При этом отмечено улучшение качества жизни большинства пациентов благодаря регрессии симптомов болезни и хорошей переносимости лечения [21].

Варианты лечения, при которых комбинируются гормональные и таргетные препараты, могут повышать эффективность терапии и предотвращать или отсрочивать появление эндокринной резистентности при РМЖ [22].

Таким образом, дальнейшие исследования по комбинации таргетных препаратов и классических цитостатиков несомненно оправданы и могут стать основой реальных достижений современной клинической химиотерапии солидных опухолей [8].

1.2.8. Новые цитостатики в лечении злокачественных опухолей

В настоящее время практически все усилия фармкомпаний сосредоточены на разработке средств для таргетной и/или иммунотерапии. Изучения и внедрения

в практику новых цитостатических агентов практически не происходит, хотя для многих пациентов, не имеющих мишеней для проведения специального лечения, именно цитостатические агенты остаются единственным шансом на излечение. В такой ситуации препаратами выбора, способными значимо повлиять на течение заболевания, являются таксаны и антрациклины.

Новые цитостатики – эпотилоны, вошедшие в клиническую практику в последние 10-15 лет, оказались особенно остро востребованы при лечении пациентов с подтвержденной резистентностью к таксанам или антрациклинам, либо больных, достигших лимитирующей дозы антрациклинов [23]. Эпотилоны – новый класс противоопухолевых макролидных антибиотиков, механизм действия которых основан на стабилизации микротрубочек, блокирующей митотическую активность, и запускающей программу апоптоза [24].

В 2007 г. FDA (Food and Drug Administration) одобрила для клинического применения полусинтетический аналог эпотилона В - иксабепилон (икземпра). В доклинических исследованиях иксабепилон продемонстрировал высокую противоопухолевую активность относительно клеточных линий рака молочной железы (РМЖ), толстой кишки, рака легкого и почки [25]. По своему механизму действия препарат схож с таксанами. Однако в доклинических исследованиях было показано, что иксабепилон эффективен как в случае первичной, так и в случае приобретенной резистентности к паклитакселу [26]. Это объясняется, по-видимому, тем, что резистентность к таксанам, так же, как и к антрациклинам, сопряжена с гиперэкспрессией Р-гликопротеина, а эпотилоны не являются субстратом для Р-гликопротеина [26]. В клинике иксабепилон продемонстрировал эффективность при резистентных формах рака молочной железы, при первичной или приобретенной резистентности к препаратам таксанового ряда и предсказуемую и контролируруемую токсичность в любой линии терапии.

Эрибулин – еще один новый цитостатик, относительно недавно зарегистрированный для применения у больных метастатическим РМЖ, ранее получавших антрациклины и таксаны. Он обладает антимиотической

активностью, действуя на микротрубочки. В отличие от таксанов и эпотилонов, основной механизм его действия заключается в способности эрибулина секвестрировать тубулин до неактивных агрегатов и, тем самым, блокировать митоз [27].

Таким образом, несмотря на значительные успехи в создании таргетных лекарственных средств для терапии злокачественных опухолей, традиционные противоопухолевые препараты по-прежнему важны для лечения многих онкологических больных, у которых опухоль либо не экспрессирует молекулярные мишени, либо не реагирует на лекарственное лечение, либо развила устойчивость к противоопухолевым агентам.

1.3. Топоизомеразы – мишени цитостатической терапии

Открытые в 70-е годы прошлого века топоизомеразы, контролирующие репликацию и транскрипцию ДНК, стали новой мишенью противоопухолевой терапии.

1.3.1. Классификация и механизм действия

ДНК-топоизомеразы – ферменты, ответственные за регуляцию топологии ДНК. Они вносят в структуру ДНК разрывы, а после релаксации суперспирали повторно их лигируют [28-32]. Существует два типа топоизомераз ДНК: тип I и тип II. Детальному анализу каталитического механизма и функций топоизомераз посвящен обзор Delgado [33].

Топоизомеразы I типа разрывают одну из цепочек дуплексной ДНК, тем самым давая возможность либо прохождению другой цепи ДНК через разрыв, либо вращению нижестоящего дуплекса ДНК вокруг разрыва с последующим «зашиванием». В результате они изменяют степень спирализации на 1 шаг [28-31].

В группе топоизомеразы I выделяют три подсемейства: топоизомеразы IA, IB и IC. Для топоизомераз подтипа IA требуется «ник» (одноцепочечный разрыв) для связывания с ДНК. Они расщепляют одну из нитей дуплексной ДНК,

ковалентно присоединяются тирозином активного центра к 5'-фосфорильной группе и используют механизм «нитевого прохода» для изменения топологии ДНК [34]. Напротив, топоизомеразы типа IV и IC расщепляют одну нить дуплексной ДНК, ковалентно присоединяются тирозином активного центра к 3'-фосфорильной группе и используют «вращающийся» механизм для релаксации суперспиралей ДНК [35].

Топоизомеразы типа II изменяют степень спирализации на 2 шага путем разрыва обеих цепочек дуплексной ДНК [т.н. «Гейт (G)-сегмент»], перенося вторую дуплексную ДНК [т.н. «Трансфер (T)-сегмент»] через разрыв или «ворота ДНК», а затем повторно связывая разорванные нити ДНК [36].

Топоизомеразы типа II претерпевают серию крупных конформационных изменений при катализе реакции механизмом «нитевого прохода». Когда топоизомеразы II типа расщепляют две цепи ДНК, они образуют фосфотирозильные связи между двумя тирозинами активного сайта и парой 5'-фосфатов для обеспечения целостности ДНК.

Существует два подтипа топоизомеразы типа II, тип IIA и тип IIB. Каждый подтип топоизомеразы структурно и функционально консервативен и образует одно семейство белков [28-31].

Топоизомеразы человека, как Top 1 (hTop 1), так и две изоформы топоизомеразы II (hTop 2), признаны в качестве терапевтических мишеней многих клинически значимых противоопухолевых препаратов. [37, 38]. Манипулирование ферментативной активностью для достижения терапевтического эффекта осуществляется тремя путями: (1) подавление активности фермента каталитическими ингибиторами; (2) повышение активности фермента в отношении разрыва ДНК; (3) превращение фермента в каталитический яд. Многие клинически успешные ингибиторы hTop 1 и hTop 2 используют механизм 3, который часто называют топоизомеразным отравлением [37, 38]. Эти «топоизомеразные яды» ингибируют топоизомеразу путем связывания с образующимся в процессе катализа промежуточным соединением

«топоизомераза-ДНК» (топоизомераза присоединяется к ДНК ковалентно) с образованием тройного комплекса «топоизомераза - лекарственное вещество – ДНК». Формирование тройного комплекса вызывает цитотоксические события, которые включают торможение репликации ДНК, генерацию двунитевых разрывов и последующую гибель клеток [37, 38].

1.3.2.Клеточные функции топоизомераз

Топоизомераза I необходима для удаления сверхспирального напряжения ДНК, которое возникает как во время репликации, так и во время транскрипции ДНК [39]. Для активации транскрипции необходимо присутствие Top 1, но не ее каталитическая активность [40]. Топоизомераза I человека (hTop I) относится к подсемейству Top IV. В клетках человека активность hTop 1 и РНК-полимеразы II взаимосвязана [41].

mTop I - единственная топоизомераза, встречающаяся исключительно в митохондриях. mTop 1 играет важную роль в транскрипции и репликации кольцевой митохондриальной ДНК. Хотя клеткам удается выживать в отсутствие mTop 1, потеря mTop 1 сильно влияет на целостность митохондрий и энергетический обмен [42, 43].

Топоизомераза II необходима для транскрипции [44, 45]. Млекопитающие имеют две изоформы Top 2: Top 2 α и Top 2 β [46]. Эти изоформы гомологичны по аминокислотной последовательности примерно на 70%. Они проявляют сходную каталитическую активность, но имеют различные клеточные функции. Top2 β экспрессируется почти во всех тканях, тогда как экспрессия гена Top2 α ограничивается тканями с высокой долей клеточной пролиферации. Top2 α участвует в процессе репликации, играя решающую роль в разделении спиралей ДНК и в уплотнении и сегрегации хромосом во время митотических делений. Top2 α считается маркером клеточной пролиферации, но ее невозможно обнаружить в дифференцированных клетках. При этом, Top2 β экспрессируется на значительном уровне и в нормальных тканях, и в опухолевых, однако, как

правило, ее экспрессия более выражена в пролиферирующих клетках и опухолях [47].

1.3.3. Механизмы блокирования топоизомеразы типа I

Существует корреляция между уровнем экспрессии hTop I и чувствительностью клеток к ингибиторам Top I. В здоровых клетках наблюдается более низкий уровень экспрессии hTop I. Быстро делящиеся раковые клетки экспрессируют более высокий уровень hTop I. В качестве мишеней ингибиторов hTop I были выбраны опухолевые клетки с повышенной или «сверхэкспрессией» hTop I.

Механизм действия препаратов, классифицируемых как ингибиторы Top I, основан на захвате созданного ковалентного комплекса Top I-ДНК и предотвращении его расщепления. Это приводит к необратимому разрушению нитей ДНК и, следовательно, к остановке клеточного цикла и индукции запрограммированной гибели клеток - апоптоза.

В настоящее время единственной группой ингибиторов Top I, используемых при лечении онкологических заболеваний, являются камптотецины. Высокая эффективность этих соединений сопровождается выраженными побочными эффектами (диареей, нейтропенией и др.). Кроме того, камптотецины характеризуются химической нестабильностью. Соединения быстро инактивируются в крови, поэтому для предотвращения быстрого распада ковалентных комплексов Top I-ДНК после инактивации препарата необходимы длительные инфузии [48]. Описанные ограничения на применение камптотецинов побудили ученых исследовать новые некамптотециновые ингибиторы топоизомераз.

1.3.4. Поиск новых некамптотециновых ингибиторов топоизомераз

Поиски некамптотециновых ингибиторов Top I и Top II ведутся среди самых разнообразных химических структур. Описаны двойные или мультитаргетные ингибиторы топоизомеразы I/II (бензофеназины,

бензопиридоиндолы, тиохроманоны, гетероциклические соединения и т. п.) [49-51]. В настоящее время поиск ингибиторов проводится также среди фторхинолонов, индолохинолинов, нафтохинонов, хальконов, бензальдегидов, имидазопиридных, гетероциклических конденсированных азотсодержащих соединений, нуклеозидных ингибиторов топоизомераз, производных бензотиазола, антрациклинов, антрафурандионов.

Среди фторхинолонов наиболее мощными ингибиторами оказались офлоксацин, спарфлоксацин, цiproфлоксацин и особенно моксифлоксацин, который образовывал комплексы с Top2 α и останавливал репликацию ДНК [52]. Как индуктор апоптоза с множественным ингибирующим действием в отношении Top2 β и тирозинкиназы на клетках рака предстательной железы и 2 линиях рака поджелудочной железы было охарактеризовано новое бис-фторхинолоновое хальконподобное производное (авторский шифр HMNE3) [53]. В 2002 году было впервые описано первое синтетическое противоопухолевое производное хинолона - восароксин (ворелоксин), механизм действия которого основан на ингибировании топоизомеразы II и индукции сайт-специфических разрывов в двухцепочечной ДНК [54]. В настоящее время проводятся клинические исследования, касающиеся применения восароксина с азациитидином при лечении пожилых пациентов с острым миелоидным лейкозом.

В ряду индолохинолинов была показана цитотоксичность на 2 линиях беспигментной меланомы кожи человека для противомаларийного препарата криптолепина. Она сопровождалась снижением топоизомеразной активности и индукцией апоптоза [55].

Среди нафтохинонов особое внимание уделено лапахолу – веществу, выделенному из растений семейства *Vignoniaceae*. Лапахол вызывал повреждение ДНК и индукцию апоптоза в опухолевых клетках *in vitro* и *in vivo* на крысиной глиоме С6 [56, 57].

Среди хальконов интерес вызвали гетероароматические циклические эпоксид- или тиоэпоксидзамещённые производные, более активно

ингибировавшие топоизомеразу по сравнению с камптотецином и этопозидом [58].

Среди бензальдегидов был найден куминальдегид, подавлявший цитопролиферацию за счёт индукции апоптоза. Одновременно он ингибировал активность Top1 и Top2 топоизомераз и теломеразы в клетках аденокарциномы лёгкого, плоскоклеточного рака лёгкого и аденокарциномы толстой кишки человека [59].

Среди имидазопиридинов найдено активное соединение, ингибирующее пролиферацию ряда клеточных линий опухолей человека и индукцией апоптоза. Анализ Top2-опосредованной релаксации ДНК позволил выявить ингибирование активности фермента, что позволило отнести соединение к ингибиторам топоизомераз [60].

Среди гетероциклических конденсированных азотсодержащих соединений одно из платиновых производных фенантриплатин проявило себя как яд Top2 в дополнение к ингибированию ДНК- и РНК-полимераз. При этом механизм образования ковалентного комплекса ДНК-Pt иной, чем у известных топоизомеразных ядов. Предполагается, что эта особенность откроет возможность разработки неклассических противоопухолевых агентов, способных преодолевать лекарственную резистентность к платиновым соединениям I поколения [61].

В ряду акридинов на основе алкалоида акроницина, проявившего активность против солидных опухолей в эксперименте, были синтезированы соединения с антипролиферативной и антитопоизомеразной активностью. Алкалоиды пиридоакридины – амфимедин и неоамфимедин – проявили Top2-опосредованную цитотоксичность на восьми линиях опухолевых клеток. В ряду активных ингибиторов топоизомеразы II также стоят триазолоакридон, имидазоакридинон и акридининдолльные гибриды [62]. В классе акридинов был найден препарат амсакрин - ингибитор hTOP IIb. [63]. Препарат, одобренный в 1983 году в Канаде, используется для лечения пациентов с острым

миелобластным лейкозом (ОМЛ) и рефрактерным острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ).

В ряду нуклеозидных соединений выявлены селективные ингибиторы топоизомеразы II и гистон-деацетилаз, для которых была показана зависимость ингибирующей активности от наличия в структуре фрагментов катехиновой природы [64].

В ряду производных бензотиазола значимые результаты демонстрируют 1-иминоизоиндолины, замещённые амидинобензотиазолами и амидинобензимидазолами изоиндолин-1-оны [65]. В этом ряду были найдены двойные ингибиторы Top1/2, проявляющие высокую цитотоксичность. В рамках клинических испытаний было изучено несколько двойных ингибиторов топоизомераз I/II, но лишь одно оказалось сопоставимо по цитотоксичности с камптотецином [66].

В настоящее время проводятся клинические испытания соединений из групп индолокарбазолов, инденоизохинолинов, и дибензонафтиридинов. Среди индолокарбазолов - синтетических аналогов антибиотиков, выделенных из актиномицетов [67] - перспективным некамптотецином считается эдотекарин - сильный и специфичный ингибитор топоизомеразы I. Стабильность ковалентных комплексов ДНК-топоизомеразы I, образующихся в результате активности эдотекарина, обеспечивает более длительную эффективность препарата [68]. Эдотекарин проходит клинические испытания на пациентах с распространенными или метастатическими химиорезистентными солидными опухолями.

Группа ингибиторов Top I – инденоизохинолины - синтетические соединения с хорошей химической стабильностью и улучшенной стабилизацией ковалентных комплексов ДНК–фермент–лекарственное средство. Из более чем 400 синтезированных соединений два проходят клинические испытания: индотекан и индимитекан [69, 70].

Дибензонафтиридины – ещё одна новая группа соединений, обладающих мощной противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo* [71]. Наиболее

перспективным представителем этой группы является топовал с более сильным цитотоксическим действием по сравнению с топотеканом. Благоприятный профиль цитотоксичности и высокую активность на моделях ксенотрансплантатов показало производное Генз-644282. Завершена I фаза клинических испытаний безопасности и переносимости этих соединений в терапии солидных опухолей.

1.3.5. Ингибиторы топоизомеразы II

Препараты, классифицируемые как ингибиторы топоизомеразы II, делятся на две группы: яды топоизомеразы или каталитические ингибиторы. Доксорубин, хинолоны и многие другие противоопухолевые или антибактериальные препараты действуют как яды топоизомеразы. Каталитические ингибиторы блокируют способность топоизомеразы прикрепляться к субстрату. Независимо от способа действия, и те, и другие приводят к гибели клеток путем апоптоза.

К ядам топоизомеразы II относят эпиподофиллотоксины. Клинически значимым препаратом из этой группы является этопозид [72]. Он был одобрен FDA в 1983 году и используется для лечения лимфом, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), рака яичек и яичников [73]. Модификация структуры этопозиды привела к значительному увеличению растворимости этого соединения, улучшению проницаемости в клетки и усилению цитотоксичности. Завершены клинические испытания производного F14512 в сочетании с цитарабином у пациентов с ОМЛ.

Тенипозид - аналог этопозиды. Одобрен FDA в 1992 году и, в основном, используется в терапии острого лимфолейкоза у детей, глиоме, опухолей центральной нервной системы и мочевого пузыря [74].

Механизм действия каталитических ингибиторов основан на предотвращении образования ДНК-ТорIIА связей, стабилизации ДНК путем образования нековалентных комплексов с ТорIIА или блокировании сайта

связывания АТФазы [76]. К ним относятся дексразоксан и мербарон. Дексразоксан - производное этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (группа бисдиоксопиперазина) [77]. На сегодняшний день он является единственным препаратом, одобренным для лечения кардиотоксичности, вызванной антрациклином. Мербарон - аналог тиобарбитурата. Было установлено, что мербарон является не только цитотоксическим, но и генотоксичным соединением. Он не одобрен в качестве терапевтического средства. В настоящее время препарат используется в качестве инструмента для исследований по Top II [78].

Анализ литературы показал, что среди ингибиторов топоизомераз ведется интенсивный поиск противоопухолевых лекарственных средств по пути, как модификации базовых структур, так и синтеза новых соединений. Приведенные исследования позволили проанализировать механизмы реализации антипролиферативного действия различных ингибиторов топоизомеразы. Особый акцент сделан на тех соединениях, которые обладают избирательной цитотоксичностью в отношении злокачественных клеток. Это свойство, сопряженное с множественным или мультитаргетным механизмом действия у новых высокоактивных ингибиторов топоизомераз различной природы, позволяет надеяться на пополнение арсенала противоопухолевых средств.

1.4. Антрациклины и антрацендионы – ингибиторы топоизомераз

1.4.1. Антрациклиновые антибиотики

На протяжении более 50 лет антрациклиновые антибиотики в сочетании с различными цитотоксическими или таргетными агентами были частью многих эффективных протоколов лечения в онкологии [14, 47, 79].

Характерной особенностью производных антрациклинов является то, что структуры отдельных соединений незначительно отличаются друг от друга, однако, эти незначительные модификации вызывают значительные изменения в их активности.

Антрациклины, имеющие важное клиническое значение:

Доксорубицин. Одобренный FDA в 1974 году, он используется для лечения широкого спектра солидных опухолей и опухолевых заболеваний кроветворной системы, включая рак молочной железы, рак яичников, саркому Капоши, опухоль Вильмса, рак щитовидной железы, рак желудка острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), болезнь Ходжкина [79]. Доксил - липосомальная лекарственная форма доксорубицина - применяется при лечении саркомы Капоши, связанной со СПИДом, множественной миеломы и рака яичников [80]. Доксорубицин является одним из наиболее эффективных противоопухолевых антибиотиков, но его применение ограничено кумулятивной дозозависимой кардиотоксичностью [81-82].

Даунорубицин обладает аналогичными доксорубицину терапевтическими эффектами [83]. Наиболее значимые проявления токсичности препарата - миелосупрессия и кардиотоксичность. При длительном применении существует риск развития отдаленных побочных эффектов в виде вторичных злокачественных опухолей.

Эпирубицин. В 1999 году был одобрен для клинического применения в Соединенных Штатах [84]. Его противоопухолевая активность была подтверждена в отношении широкого спектра опухолей, но в основном, он используется против прогрессирующего рака молочной железы. В некоторых режимах химиотерапии эпирубицин предпочтительнее доксорубицина, поскольку он имеет меньше побочных эффектов. Липосомальный эпирубицин показал себя эффективным средством для лечения глиомы головного мозга [85].

Валрубицин - полусинтетический аналог доксорубицина с улучшенным профилем безопасности и отсутствием местно-раздражающего действия. Соединение было одобрено FDA в 1998 году для внутривенного введения пациентам с БЦЖ-рефрактерной карциномой *in situ*. [86].

Карминомицин был открыт Г.Ф. Гаузе. Его спектр противоопухолевой активности и побочное действие заметно отличается от других антрациклинов.

Это - единственный антибиотик среди природных антрациклинов, который хорошо всасывается из пищеварительного канала и проявляет высокую противоопухолевую активность как при пероральном, так и при внутривенном применении [87].

Идарубицин, полученный синтетически как аналог даунорубицина (Заведос®, Zavedos®, Pfizer, США), высокоактивен в отношении широкого спектра опухолей и может применяться перорально [15].

1.4.2. Механизм действия антрациклиновых антибиотиков

Механизмы цитотоксического действия антрациклинов подробно исследованы [88, 89]. Их противоопухолевая активность во многом обусловлена способностью интеркалировать между парами нуклеотидов клеточной ДНК, вызывая нарушения её матричных функций, и ингибированием топоизомеразы II, участвующей в процессах репликации и транскрипции. Антрациклины нарушают функцию хеликаз, ответственных за расхождение нитей ДНК во время деления. При интеркаляции в ДНК и связывании с ферментами антрациклины нарушают их трехмерную структуру. Являясь мембраноактивными соединениями, они оказывают непосредственное влияние на внутриклеточную передачу сигналов. Во всех внутриклеточных компартментах, включая ядро и митохондрии, антрациклины циклически подвергаются восстановлению и окислению до химически активных соединений, которые в присутствии кислорода индуцируют образование свободных радикалов (ROS). Возникающий при этом окислительный стресс выражается в повреждении липидов мембран, оснований ДНК и транспортных белков. Все это обеспечивает высокую активность этих препаратов. В то же время они не обладают достаточной избирательностью противоопухолевого действия, проявляя различные виды токсичности, в том числе кардиотоксичность, лимитирующую их применение.

Молекулярной основой активности антрациклинов считается действие препаратов на Top2a, поскольку эта изоформа играет главную роль в репликации

и пролиферации клеток [88, 89]. Роль Top2 β обычно связывают с долгосрочными побочными эффектами антрациклинов, такими как кардиотоксичность и вторичные злокачественные новообразования, однако Top2 β также может способствовать проявлению цитотоксической активности препаратов.

Механизм действия антрациклиновых антибиотиков не ограничивается только ингибированием топоизомераз. Он гораздо более многопланов. Так, оказалось, что антрациклины могут усиливать экспрессию специфических генов интерферона в опухолевых клетках, которые затем стимулируют врожденный иммунитет хозяина. В свою очередь, стимуляция иммунной системы может способствовать противоопухолевой активности доксорубицина [90].

Антрациклины могут приводить опухолевые клетки к гибели не только путем апоптоза, но и посредством активации других типов программированной смерти, включая иммуногенную смерть [91].

Более полное определение структурных аспектов и молекулярных путей взаимодействия антрациклинов с опухолями может открыть новые возможности клинического применения этих ингибиторов Top2.

1.4.3. Поиск аналогов антрациклинов с улучшенными свойствами

С тех пор, как было установлено, что антрациклины являются высокоэффективными ядами TopII в эукариотических клетках [92], непрерывно проводились интенсивные исследования в поисках лучших аналогов или новых агентов с улучшенными биологическими свойствами. Так, был синтезирован ряд новых аналогов даунорубицина, доксорубицина и эпирубицина. Новые производные обладали антипролиферативной активностью, аналогичной или более высокой, чем у исходных антибиотиков. Их токсичность, в том числе и кардиотоксичность, была значительно ниже. Оказались более эффективными морфолиновые аналоги доксорубицина и даунорубицина [93].

В последующее десятилетие был получен целый ряд природных, полусинтетических и синтетических антибиотиков, проявивших

противоопухолевые свойства и способность ингибировать активность как Топ II, так и Топ I. Тетраценомицин [94], ангидромэггимицин [95], сайнтопин (УСТ-1003, 7) – ингибиторы Топ II. У близкого ему по структуре UCE6 [96] клеточной мишенью оказалась топоизомераза I [97]. Клеточными мишенями гетероциклических аналогов сайнтопина -топопиранов - являются и топо II, и топо I [98]. Из семейства природных антрациклинов - ариметамицинов, выделенных из почвы после гетерологичной экспрессии бактериальной ДНК, наиболее перспективным признан ариметамицин, проявляющий наномолярную активность против линии клеток с множественной лекарственной устойчивостью к антрациклину [99].

Часть из множества новых антрациклинов дошла до клинических испытаний, некоторые внедрены в клиническую практику отдельных стран. Ниже наиболее активным и перспективным дана краткая характеристика.

Амрубицин – синтетическое соединение с мощной противоопухолевой активностью, основанной на ингибировании hТоп II. В Японии амрубицин был одобрен для лечения пациентов с немелкоклеточным и мелкоклеточным раком легкого. Продолжается II фаза клинических испытаний его сочетания с пембролизумабом в лечении рефрактерного мелкоклеточного рака легкого. Завершена фаза II исследования амрубицина для лечения рецидивирующих или рефрактерных злокачественных опухолей тимуса и HER2-негативного метастатического рака молочной железы [100].

Альдоксорубицин – продраг доксорубицина, состоящий из молекулы доксорубицина, конъюгированной с линкером (гидразид 6-малеимидокапроновой кислоты). Проведены многочисленные клинические исследования его эффективности при монотерапии и в сочетании с другими химиотерапевтическими средствами в лечении различных видов рака [101].

Пирарубицин – менее кардиотоксичен, чем доксорубицин. В Японии его применяют в комбинации с циклофосфамидом, винкристином и преднизолоном при лечении неходжскинской лимфомы у пожилых пациентов [102].

Неморубицин – полусинтетический аналог доксорубицина, несущий морфолино-замещенное кольцо, связанное с положением С-3' фрагмента сахара. В настоящее время проходит II/III фазу клинических испытаний в качестве средства для лечения гепатоцеллюлярного рака [103].

Аннамицин – разработан для лечения рецидивирующего или рефрактерного ОМЛ. Практически не обладает кардиотоксичностью, преодолевает множественную лекарственную устойчивость, и проявляет активность у пациентов, для которых стандарт лечения оказался не эффективным. Аннамицин в липосомальной лекарственной форме изучается в двух клинических испытаниях фазы I / II в США и Польше [104].

Акларубицин – отличается от доксорубицина структурой, механизмом действия, и профилем токсичности. При испытании на больных метастатическим раком молочной железы активности не проявил. Дозо-лимитирующая токсичность – лейкопения, тяжелая тошнота и рвота. [105].

Таким образом, к настоящему времени выделено, синтезировано и изучено значительное количество разнообразных производных природных, синтетических и полусинтетических антрациклинов. Однако, огромные усилия последних десятилетий, направленные на открытие более эффективных аналогов, в значительной степени потерпели неудачу. В этом контексте возникает вопрос: останутся ли антрациклины, по-прежнему, важным активом для онкологов [47], т.к. все еще не удалось преодолеть их недостатки, основным из которых является высокая кардиотоксичность [81-82].

1.4.4. Роль топоизомераз в развитии и преодолении кардиотоксичности антрациклинов

Поиски путей преодоления кардиотоксичности антрациклинов не прекращаются на протяжении всего периода их клинического использования, однако текущая стратегия ее предотвращения заключается в ограничении кумулятивной дозы препарата.

В настоящее время основным механизмом кардиотоксичности антрациклинов считается окислительный стресс, обусловленный повышенным уровнем активных форм кислорода (АФК) и перекисного окисления липидов. [106]. АФК возникают также в результате образования комплексов доксорубицин-железо [107,108]. Особенно чувствительны к окислительному стрессу кардиомиоциты.

hTop2 β является единственной топоизомеразой, экспрессируемой в кардиомиоцитах [109]. Ее экспрессия вносит свой вклад в механизм кардиотоксичности доксорубицина. [110]. Оказалось, что каталитический ингибитор hTop2 β – дексразоксан [76], обладает кардиопротекторными свойствами, которые объясняются тем, что с одной стороны, дексразоксан действует путем ареста топоизомеразы в определенной точке каталитического цикла. С другой – хелатирует свободное железо и железо, находящееся в комплексе с антрациклином, что предотвращает образование кардиотоксичных активных форм кислорода [111]. На сегодняшний день он является единственным препаратом, одобренным для лечения кардиотоксичности, вызванной антрациклинами. Дексразоксан (ICRF-187 или Zinecard) используется в комбинации с доксорубицином у больных метастатическим раком молочной железы, которые уже получали лечение доксорубицином в дозе ≥ 300 мг/м² [76].

Таким образом, ингибиторы Top II могут быть использованы для предотвращения токсического воздействия антрациклинов. По-видимому, новые аналоги антрациклинов должны представлять собой ингибиторы, специфичные одновременно и для Top2 α , и для Top2 β . При этом, ингибиторы, специфичные для Top2 β , не должны оказывать отрицательного влияния на противоопухолевую активность Top2 α . Исследование роли топоизомераз в развитии и преодолении кардиотоксичности антрациклинов подтверждает, что дальнейшее развитие этого класса противоопухолевых лекарств должно идти в направлении создания мультитаргетных препаратов.

1.4.5. Антрацендионы

Химические исследования, направленные на модификацию природных антрациклинов и синтез новых препаратов с улучшенными свойствами привели к открытию противоопухолевых аминоалкиламиноантрахинонов (антрацендионов) [112]. Среди множества полученных соединений для дальнейших исследований были выбраны аметантрон и митоксантрон [113].

В ходе клинических испытаний аметантрон продемонстрировал высокую противоопухолевую эффективность и низкое кардиотоксическое действие [114].

Митоксантрон в тестах *in vitro* и *in vivo* оказался более активным, чем антрациклины. При клиническом использовании было выявлено, что он менее кардиотоксичен, чем доксорубин [115]. Митоксантрон образует комплексы с Top II и ДНК, чем обусловлен его цитотоксический эффект. Но, в отличие от доксорубина, он в меньшей степени генерирует свободные радикалы, что объясняет его низкую кардиотоксичность. При лечении митоксантроном формируется множественная лекарственная устойчивость, имеющая такие же механизмы формирования, как и у других антрациклинов [116].

Митоксантрон в 1987 году был разрешен к применению FDA и в настоящее время является единственным клинически одобренным препаратом из группы производных антрацендиона [117]. Хотя он обладает лучшей переносимостью, чем антрациклины, однако при длительном лечении развивается кардиомиопатия [118]. В настоящее время клиницисты пришли к выводу, что, по-видимому, связь митоксантрона с долгосрочным риском кардиомиопатии значительно недооценена [119] что, наряду с формированием множественной лекарственной устойчивости, послужило стимулом для дальнейших поисков в этом направлении.

Изыскания противоопухолевых препаратов проводились и в ряду гетероциклических антрахинонов. В ряду гетероциклических аналогов аметантрона были найдены более активные по сравнению с родительским соединением производные [120]. Некоторые аналоги аминоалкиламиноантрахинонов и аминоалкиламинопирозолоантронов

превосходили по противоопухолевой активности доксорубицин [112]. Был синтезирован ряд производных бисантрапиразола, содержащих пиперазиновые линкеры. Структурно они подобны антрациклам, но ингибируя Top II, действуют не как яды топоизомеразы [121].

Щекотихин и соавторы, исследуя производные антра[2,3-b]фуран-3-карбоксамиды, обнаружили, что некоторые соединения являются двойными ингибиторами Top I/Top II [122]. Они образуют стабильные интеркаляционные комплексы с дуплексной ДНК и ослабляют релаксационную активность Top I и Top II с помощью механизма, отличного от топоизомеразных ядов.

Сравнительно недавно был открыт перспективный класс противоопухолевых ингибиторов топоизомераз на основе гетероциклических производных антрахинона - производные антра[2,3-b]фуран-5,10-диона. Замещением пропоксигрупп диаминами была получена первая серия 4,11-диаминоантра[2,3-b]фуран-5,10-дионов – аналогов аметантрона. Оказалось, что антрафурандионы обладают наибольшей активностью среди конденсированных гетероаренантрацендионов с одним гетероатомом [123, 124].

Среди соединений с высокой цитотоксичностью наибольшую активность проявил антра[2,3-b]фуран-5,10-дион, содержащий дистальные метиламиногруппы. К тому же он оказывал выраженное ингибирующее влияние на рост клеточных линий с множественной лекарственной устойчивостью, избыточным синтезом Р-гликопротеина или делецией гена p53. Кроме того, это соединение блокировало *in vitro* Top I-опосредованное раскручивание ДНК в низких микромолярных концентрациях [123].

Соединения второй серии производных 4,11-диаминоантра[2,3-b]фуран-5,10-диона с различными боковыми цепями отличались от предыдущих аналогов отсутствием алкильной группы в фурановом кольце и высокой антипролиферативной активностью [123]. Лучшие результаты были получены с 2-незамещёнными производными, содержащими боковые амино- и метиламиногруппы. В этом ряду были выявлены соединения с множественными

механизмами цитотоксичности, включая ингибирование Top I/Top II-опосредованной релаксации ДНК, снижение соотношения NAD⁺/NADH через ингибирование tNOX, подавление NAD⁺-зависимой активности деацетилазы Сиртуин 1 (SIRT1) и активацию каспазо-опосредованного апоптоза. Впервые было показано, что опухоль-ассоциированные NADH-оксидазы (tNOX) и SIRT1 являются важными клеточными мишенями противоопухолевых антрацен-9,10-дионов. Позднее было обнаружено, что антрафурандион обладает высокой аффинностью к G-квадруплексам из 5'-нетранслируемого участка мРНК транскрипта онкогена KRAS и способен дозозависимо ингибировать синтез белка p21KRAS в опухолевых клетках [124].

Другим перспективным химотипом для поиска противоопухолевых ингибиторов топоизомераз являются производные антрафуран-3-карбоксамиды. Наиболее изученное соединение этого ряда – антрафуран (ЛХТА-2034), отличающийся наличием аминопирролидидкарбонильной группы в положении 3 гетероцикла, а также гидроксигрупп в положениях 4,11 [125]. Антрафуран ЛХТА-2034 в низких концентрациях ингибирует Top I и II, а также ряд важных для опухолевого роста протеинкиназ (Aur B, Pim) [126-128].

Таким образом, производное антрафуран-3-карбоксамиды (антрафуран) – высокоэффективный мультитаргетный ингибитор топоизомераз I и II. Множественный механизм его антипролиферативного действия реализуется также в отношении протеинкиназ AurB и Pim. Антрафуран высокоактивен на линиях клеток с различными фенотипами множественной лекарственной устойчивости. На основании вышеперечисленных свойств он отнесён к перспективным цитотоксическим противоопухолевым агентам [129].

Заключение

Анализ литературы показал, что фундаментальным достижением последних десятилетий является образование нового класса «таргетных» препаратов, воздействующих на внутриклеточные молекулярные мишени, имеющие ключевое значение для жизнедеятельности опухолевой клетки. Сегодня таргетная терапия

рассматривается как приоритетное направление в лечении онкологических заболеваний. В настоящее время практически для всех солидных опухолей и гемобластозов разработаны и введены в клиническую практику таргетные лекарства. Благодаря таргетной терапии стало возможным лекарственное лечение целого ряда злокачественных опухолей, ранее считавшихся инкурабельными. По мере развития этого направления появляются не только новые препараты, но и открываются новые показания к их использованию, исследуются новые сочетания и режимы комбинированной таргетной терапии.

Препятствием эффективного применения таргетной терапии являются обширные связи между сигнальными путями, что позволяет части опухолевых клеток использовать другие пролиферативные сигналы, и возникающие мутации в рецепторах, которые могут приводить к потере чувствительности опухолевой клетки к ингибитору сигнальной трансдукции. Разработка мультитаргетных препаратов или сочетанного применения нескольких таргетных препаратов позволила бы подойти к решению проблемы преодоления этой особенности злокачественного роста.

Дальнейшее повышение эффективности лечения возможно также при включении в арсенал противоопухолевой химиотерапии комбинаций таргетных препаратов с цитостатиками. Такие варианты лечения могут повышать эффективность терапии и предотвращать или отсрочивать появление резистентности.

Традиционные противоопухолевые препараты по-прежнему важны для лечения многих онкологических больных, у которых опухоль либо не экспрессирует молекулярные мишени, либо не реагирует на лекарственное лечение, либо развила устойчивость к противоопухолевым агентам.

На протяжении десятилетий важным активом для онкологов остаются антрациклины, Механизмы цитотоксического действия антрациклинов подробно исследованы. Их противоопухолевая активность во многом обусловлена ингибированием топоизомеразы II, участвующей в процессах репликации и

транскрипции. К настоящему времени выделено, синтезировано и изучено значительное количество разнообразных производных антрациклинов, однако, все еще не удалось преодолеть их недостатки, основным из которых является высокая кардиотоксичность.

Изучение ингибиторов Top II показало, что они могут быть использованы для предотвращения токсического действия антрациклинов. Так, оказалось, что каталитический ингибитор hTop2 β – дексразоксан – обладает кардиопротекторными свойствами. На сегодняшний день он является единственным препаратом, одобренным для лечения кардиотоксичности, вызванной антрациклинами.

В ходе интенсивного поиска противоопухолевых лекарственных средств среди ингибиторов топоизомераз особый акцент сделан на тех соединениях, которые обладают избирательной цитотоксичностью в отношении злокачественных клеток. Это свойство, сопряженное с множественным или мультитаргетным механизмом действия у новых высокоактивных ингибиторов топоизомераз различной природы, позволяет надеяться на пополнение арсенала противоопухолевых средств. Наиболее перспективными можно считать мультитаргетные гетероциклические конденсированные азотсодержащие соединения, в том числе противоопухолевые антрафурандионы с хорошим выходом активных оригинальных ингибиторов, одним из которых является Антрафуран. Доклиническое изучение этого оригинального агента представляется чрезвычайно актуальной задачей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены в соответствии с рекомендациями, изложенными в действующем в РФ «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств», и Правил лабораторной практики в Российской Федерации [130].

2.1. Лабораторные животные

Мыши и крысы были получены из Центрального питомника РАН «Андреевка», кролики – из филиала «Электрогорский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животных содержали в условиях вивариев ФГБНУ «НИИНА» или ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, соответствующих Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) [131]. Кормление животных осуществляли в соответствии с приказом МЗ СССР №1179 от 10 октября 1983 года «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения». Суточный рацион на всём протяжении исследования включал лабораторный экструзированный гранулированный корм (сертификат соответствия №РОСС RU, ПР 98. Д 00497 до 07.02.2016 г., ГОСТ Р 51849-2001 Р.5) и питьевую водопроводную воду *ad libitum* (ГОСТ 2874-82 «Вода питьевая»). Мониторинг температуры и влажности осуществляли с помощью климатической установки, температура воздуха составляла 18-22°C, относительная влажность 50-65%. В комнатах содержания животных поддерживался 12-часовой цикл освещения и 8-10-ти кратная смена объема воздуха в час. Условия содержания животных соответствовали действующим в РФ требованиям международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований, изложенных в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», ЕЭС, Страсбург [132], Хельсинкской декларации и Всемирной

медицинской ассоциации [133-137]. После двухнедельного карантина здоровых животных вводили в эксперимент.

В работе были использованы:

Мыши: 182 шт. BDF₁ [C57Bl_{6j}×DBA₂] 18-22 г, самки и самцы;

45 шт. DBA₂ 18-22 г, самки и самцы;

26 шт. C57Bl_{6j} 18-22 г, самцы;

15 шт. Balb/c nude 20-22 г, самки иммунодефицитные, 8-9 недель

Крысы - 150 шт. Wistar самки и самцы массой тела 150–170 г.

Кролики - 18 шт. «Советская шиншилла», самцы массой тела 1,8 – 2,0 кг.

Мышей Balb/c nude содержали в условиях специализированного кондиционированного вивария в макролоновых клетках с твердым основанием, аксессуарами и аэросистемой (бумажный фильтр, бутылка внутри, CageTypeII – Hoodofopendesign) фирмы «EHRETGNBA» (Германия) со свободным доступом к воде с соблюдением конвенциональных требований [138].

2.2. Опухолевые модели

Для оценки специфической активности антрафурана были использованы штаммы перевиваемых опухолей мышей и человека из Банка и Коллекции ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, прогностически значимые для доклинических исследований потенциальных противоопухолевых средств [130, 139]:

P388 – лимфолейкоз;

LLC – эпидермоидная карцинома лёгких Льюис;

T47D – адаптированная к росту подкожно у мышей-самок Balb/c nude культура клеток рака молочной железы (РМЖ) человека. Исходная линия клеток - протоковый рак, полученный из плеврального выпота больной с метастатическим плевритом. Экспрессия рецепторов: кальцитонин, андрогены, эстрогены (аутокринно), прогестероны, глюкокортикоиды, пролактины, АФП [130, 141].

2.3. Образцы препарата для исследований

Антрафуран – S-изомер метансульфоната 3-[(3-амино-1-пирролидинил)карбонил]-4,11-дигидрокси-2-метилантра[2,3-b]фуран-5,10-диона (номенклатура ЮПАК), мол. масса – 502, кристаллическое вещество кирпично-красного цвета, хорошо растворимо в воде при комнатной температуре. Субстанция и лекарственные формы предоставлены проф. А.Е. Щекотихиным (лаборатория химической трансформации антибиотиков ФГБНУ «НИИНА»). Прототипы лекарственной формы для парентерального и перорального применения (например, гранулированная композиция в желатиновых капсулах для кроликов) были приготовлены добавлением к субстанции аптечного или химически чистого солюбилизатора (физ. раствор хлористого натрия, ПЭГ, 5% глюкоза, вода для инъекций, 1% раствор крахмального клейстера). Изученные ранее химико-физические, химико-фармацевтические и биологические свойства антрафурана опубликованы в ряде статей [122, 123, 125, 128, 141, 142].

2.4. Оценка эффективности антрафурана

Инокулят мышинных опухолей для трансплантации готовили из опухолевого материала доноров и прививали *ex tempore* по стандартной методике: P388 - в/б по $1,0 \times 10^6$ клеток на мышь; LLC - п/к 10% взвесь по 50 мг на мышь. Прививочная доза инокулята РМЖ человека составляла $1,2 \times 10^7$ клеток на мышь.

Всем взятым в опыт животным в день "0" трансплантировали опухолевый инокулят. В день начала опыта всех мышей взвешивали на электронных весах MW-Tseries, User'sManual («CAS», США, цена деления 0,01 г) и перед началом лечения рандомизированно делили на группы в соответствии с задачами исследования. Терапию проводили однократно или многократно (ежедневно или с интервалами) парентерально (в/б или в/в) или п/о, начиная через 1 – 3 дня после трансплантации опухоли. Для введений животным использовали индивидуальные пластиковые 1,0 мл шприцы. Перорально агенты вводили с помощью стерилизованного *ex tempore* многоразового металлического зонда. Дозы всегда рассчитывали индивидуально на массу тела мыши, вводимые разовые объемы

соответствовали физиологическим нормам для каждого пути введения. Основные группы мышей получали лечение исследуемыми агентами (схемы приведены в главах с описанием результатов). Одну группу оставляли без специфического лечения для контроля роста опухоли (КРО) и применяли этим мышам стерильный физиологический раствор, 5% раствор глюкозы или питьевую воду в зависимости от пути введения исследуемого агента в адекватной схеме.

При оценке эффективности антрафурана были использованы стандартные показатели и критерии [3, 130, 143]:

- увеличение продолжительности жизни (выживаемость) $T/C \geq 125\%$ («treatment/control») по формуле:
 $T/C\% = [СПЖ_{\text{опыта}} / СПЖ_{\text{контроля}}] \times 100\%$, где СПЖ – средняя продолжительность жизни в днях, $СПЖ_{\text{контроля}} = 100\%$ для мышей с в/б трансплантированным лимфолейкозом Р388;
- торможение роста опухоли $TPO \geq 50\%$ по формуле
 $TPO\% = [V_{\text{срконтроля}} - V_{\text{сропыта}}] / V_{\text{срконтроля}} \times 100\%$ и, дополнительно, процент полных ремиссий (ПР%) для мышей с солидной высоко метастазирующей в легкие эпидермоидной карциномой легкого LLC;
- торможение роста опухоли $T/C \leq 42\%$ по формуле $T/C\% = [V_{\text{сропыта}} / V_{\text{срконтроля}}] \times 100\%$, где $V_{\text{срконтроля}} = 100\%$, для мышей с п/к ксенографтами РМЖ человека Т47D.

Опухолевые узлы измеряли с помощью штангенциркуля («Mitutoyo», Япония), соединенного USB-портом с компьютером. Наблюдение за мышами с трансплантированными внутрибрюшинно опухолями продолжали до гибели, в других случаях – до отсутствия ответа опухоли на лечение или достижения среднего объема $> 2,0 \text{ см}^3$ в группе КРО (международные этические требования). О переносимости лечения судили по поведению, состоянию, гибели и патологическим изменениям внутренних органов при аутопсии умерщвленных

или павших в опыте мышей. Трупы доставляли в специализированный фризер НМИЦ, после чего кремировали.

2.5. Оценка переносимости антрафурана

2.5.1. Исследование острой токсичности

Острую токсичность препарата исследовали по методу Литчфилда и Уилкоксона при однократном введении интраперитонеально, внутривенно или *per os*. Для опытов использовали половозрелых самок и самцов мышей BDF₁ и самцов крыс Wistar из питомника «Андреевка». Животных разделяли на группы по 6 голов в каждой. Субстанцию или лекарственную форму антрафурана вводили парентерально однократно в 0,2% концентрации в диапазоне доз в хвостовую вену или брюшную полость мышей или крыс при помощи пластикового шприца. При пероральном введении субстанцию вводили животным при помощи шприца со специальным желудочным металлическим зондом. Оценка состояния и поведения животных производилась в течение 3-х часов после введения препарата и далее ежедневно. Отмечали количество павших животных и сроки их гибели. Животных в агональном состоянии подвергали эвтаназии при помощи эфира для наркоза. Наблюдение продолжали в течение 30 суток после гибели последнего животного. Расчет доз, характеризующих токсичность, производили при помощи компьютерной программы «StatPlus-2006».

Стандартные расчётные дозы, характеризующие токсичность:

- ЛД₅₀ – Доза, вызывающая гибель 50% животных в диапазоне (от÷до)
- МПД(ЛД₁₀) – Максимально переносимая доза в диапазоне (от÷до)
- ЛД₁₆ – Промежуточная расчётная доза
- ЛД₈₄ – Промежуточная расчётная доза
- ЛД₁₀₀ – 100% Летальная доза

2.5.2. Исследование субхронической токсичности

Для проведения эксперимента по изучению субхронической токсичности антрафурана при пероральном пути введения животных разделяли на группы: крыс - по 10, а кроликов - по 6 голов в каждой. Крыс содержали по 5 голов в клетке, кроликов - по одному. Перед началом эксперимента у животных определяли фоновые показатели (масса тела и клинический анализ крови). Практически здоровых животных вводили в эксперимент.

Субхроническую токсичность субстанции антрафурана изучали на крысах самцах. Препарат растворяли в питьевой воде и в 2% концентрации вводили в желудок при помощи шприца со специальным металлическим зондом ежедневно на протяжении 15 дней. При расчете разовых доз для крыс исходили из терапевтических доз для мышей, пересчитанных через коэффициент поверхности тела [144]. Они составили 20 мг/кг (1 терапевтическая доза) и 100 мг/кг (5 терапевтических доз). Приготовление доз осуществлялось непосредственно перед введением.

Субхроническую токсичность лекарственной формы антрафурана изучали на кроликах самцах. Дозы для исследования были выбраны на основании изучения острой токсичности препарата на крысах и, в соответствии с методическими рекомендациями, суммарно составляли МПД и ЛД₅₀. Разовые дозы равнялись 2 и 6 мг/кг соответственно. Препарат в виде желатиновых капсул вводили в желудок ежедневно на протяжении 15 дней. Содержание препарата в капсулах рассчитывали индивидуально для каждого животного. Капсулы закладывали на корень языка и при помощи пластикового шприца с мягким силиконовым зондом в ротовую полость вводили 10 мл воды для запивания. Приготовление доз для введения осуществлялось один раз в неделю в соответствии с массой подопытных животных. Дозы хранились при комнатной температуре, но не выше +25°C.

2.5.3. Дизайн субхронических экспериментов

Введение препарата. Введение осуществлялось ежедневно в течение 15 суток в разовых дозах, соответствующих 1 ТД и 5 ТД для крыс и 1/15 МПД или ЛД₅₀ – для кроликов.

Взвешивание. Массу тела животных определяли каждые 5 дней в течение всего эксперимента при помощи весов «Сартогосм» (Россия).

Гематологическое исследование периферической крови. Клинический анализ крови (лейкоциты, лимфоциты, моноциты, эозинофилы и базофилы, гранулоциты, эритроциты, гемоглобин, лейкоформула, гематокрит и тромбоциты) производился при помощи автоматического гематологического анализатора «Abacus Junior Vet» (Diatron, Австрия) перед началом курса введений (сутки 0), на 7, 15, 18, 20, 22, 30 и 45 сутки опыта. Для определения указанных показателей кровь у крыс брали из хвостовой вены.

Биохимическое исследование сыворотки крови. Процедура осуществлялась на 1 и 30 сутки после окончания курса введений препарата при помощи автоматического биохимического анализатора ChemWell (Awareness Technology Inc., США). В сыворотке крови определяли следующие показатели: аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), креатинин, мочевины, билирубин (прямой и общий), общий белок, альбумин.

Исследование мочи. Процедура осуществлялась на 1 и 30 сутки после окончания курса введений. Определяли суточный диурез (выпито воды – выделено мочи) и при помощи автоматического анализатора Laura Smart (Erba Лахема, Чехия) производили клинический анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тельца, белок, цилиндры, соли, уробилиноген, удельный вес).

Электрокардиография. ЭКГ во втором стандартном отведении регистрировали при помощи электрокардиографа ЭК1Т-07 («Аксион», Россия) на

1 и 30 сутки после окончания курса введений. Определяли величину интервалов R-R и QT, долю интервала QT и частоту сердечных сокращений.

Патоморфологическое исследование. На 1 и 30 сутки после окончания курса введений препарата половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии. При вскрытии тщательно обследовали на предмет внешних патологических признаков, вскрывали, макроскопически оценивали состояние грудной и брюшной полости и внутренних органов, места введения исследуемых препаратов. Сердце, печень, почки, тимус и селезёнку взвешивали и определяли их массовые коэффициенты.

Патоморфологическому исследованию подлежали следующие органы:

сердце	все отделы кишечника	надпочечники
печень	поджелудочная железа	щитовидная железа
почки	селезенка	семенники
легкие	тимус	мочевой пузырь
желудок	лимфатические узлы	

Участки внутренних органов фиксировали в 10% нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин. Срезы толщиной 5-7 $\mu\text{м}$ окрашивали гематоксилин-эозином и подвергали световой микроскопии с использованием микроскопа «Olympus BX40» (Япония).

2.5.4. Статистическая обработка экспериментальных данных

Полученные при изучении токсичности количественные данные обрабатывали статистически при помощи компьютерной программы StatPlus 2006 с использованием критерия t Фишера-Стьюдента. Различия определяли как достоверные при $p \leq 0,05$.

Стандартные показатели эффективности T/C% («treatment/control») или ТРО% рассчитывали, как соотношение или разницу средних объемов опухолей (средней продолжительности жизни) в сравнении с группой КРО. Статистическую обработку производили с помощью программы Microsoft Excel.

При построении графиков для планок погрешностей были использованы: для лимфолейкоза P388 – стандартное отклонение; для солидных опухолей и оценки безопасности – стандартная ошибка средней. Результаты статистической обработки считали достоверными при $p \leq 0,05$ по критерию Фишера-Стьюдента.

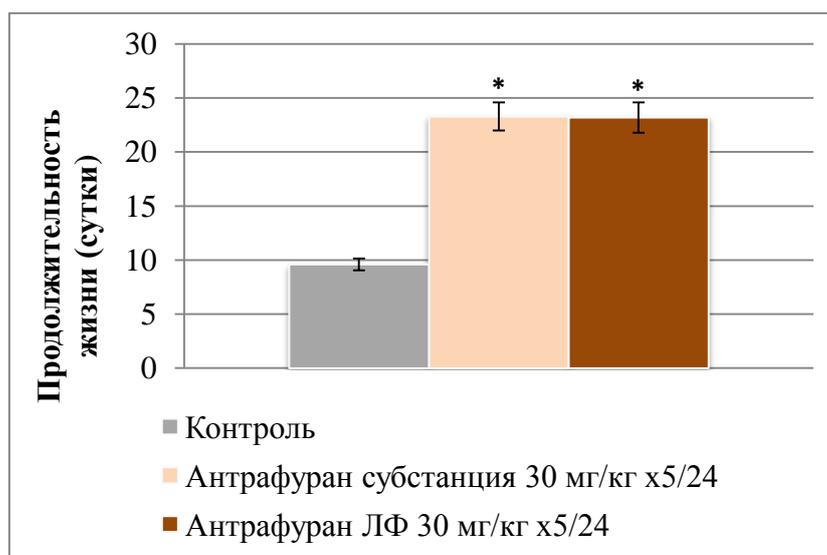
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 3. Изучение эффективности и безопасности антрафурана при парентеральном введении

3.1. Внутривнутрибрюшинное введение

3.1.1. Оценка эффективности субстанции и лекарственной формы антрафурана

Изучение эффективности антрафурана проводили на мышах с перевитым в/б лимфолейкозом Р388 в диапазоне доз от 10 до 50 мг/кг. При ежедневном пятикратном введении субстанции препарата в дозах от 10 до 30 мг/кг (суммарно от 50 до 150 мг/кг) было зарегистрировано достоверное увеличение средней продолжительности жизни мышей с лимфолейкозом Р388, Т/С=170-214% (рис. 1).



*Различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$:

СПЖ со стандартным отклонением

Рисунок 1. Средняя продолжительность жизни мышей (СПЖ) с лимфолейкозом Р-388 после внутривнутрибрюшинного введения субстанции антрафурана

Применение субстанции антрафурана в дозах 40 и 50 мг/кг приводило к гибели животных после однократного введения в первые сутки (лекарственная гибель).

В сравнительном эксперименте на мышах при в/б применении субстанции и лекарственной формы (ЛФ) препарата был получен идентичный ответ: Т/С=242% против Т/С=243% при отсутствии лейкозного асцита у всех мышей (таб. 1). Переносимость в обоих случаях была удовлетворительной, гибели от токсичности не наблюдали.

Таблица 1. Сравнительная эффективность субстанции и лекарственной формы антрафурана при ежедневном внутрибрюшинном введении мышам на 2-6 сутки после трансплантации внутрибрюшинно Р388.

Группа		Разовая доза, мг/кг	Противоопухолевый эффект	
			Т/С%	Число мышей с асцитом
Контроль, 5% глюкоза (мл) <i>n</i> =6		0,5	100	6/6
Антрафуран <i>n</i> =5	Субстанция	30	243*	0/5
	ЛФ	30	242*	0/5

*Примечание: * Различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$*

3.1.2. Оценка острой токсичности субстанции и лекарственной формы антрафурана на мышах

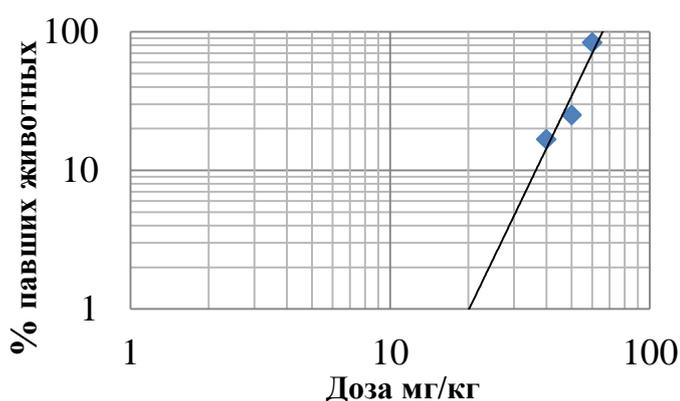
Для исследования острой токсичности 0,2% раствор субстанции антрафурана в 5% растворе глюкозы вводили мышам самцам и самкам BDF₁ в диапазоне доз от 20 до 70 мг/кг. Полученные результаты представлены в таб. 2, 3 и на рис. 2, 3.

Таблица 2. Острая токсичность субстанции антрафурана при внутрибрюшинном введении мышам самцам BDF₁.

Доза, мг/кг	Кол-во животных: пало/всего в группе	Сроки гибели
20	0/6	-
30	0/6	-
40	2/12	1 сутки
50	3/12	1 сутки
60	5/6	1 час
70	6/6	1 час

Внутрибрюшинное введение высоких смертельных доз субстанции антрафурана приводило к гибели животных в течение от 1 часа до 1 суток после введения. Перед гибелью животные становились вялыми, принимали боковое положение, у них развивалось учащенное дыхание. Затем дыхание становилось слабым и наступало апноэ. При вскрытии павших животных было обнаружено полнокровие органов брюшной полости и легких, сердце в систоле. Полученные данные позволяют предположить, что причиной смерти животных является сердечно-сосудистая недостаточность, вызванная нейротоксическим действием.

Пробит-анализ



$$LD_{50} - 52,5(47,1 \div 57,9)$$

$$МПД - 39,4(35,8 \div 43,3)$$

$$LD_{16} - 42,3$$

$$LD_{84} - 62,7$$

$$LD_{100} - 67,9$$

Рисунок 2. Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для субстанции антрафурана при внутрибрюшинном введении мышам самцам BDF₁

Определение параметров острой токсичности лекарственной формы препарата на мышах при внутрибрюшинном применении проводили на мышах самках BDF₁. Препарат вводили в диапазоне доз от 40 до 85 мг/кг.

Таблица 3. Острая токсичность лекарственной формы антрафурана при внутрибрюшинном введении мышам самкам BDF₁

Доза, мг/кг	Кол-во животных: пало/всего в группе	Сроки гибели
40	0/6	-
50	1/12	-
60	3/6	1 сутки
70	4/6	1 сутки
75	5/6	1 час
85	6/6	1 час

Клиническая картина интоксикации и гибели мышей самок была такой же, как для субстанции. Однако широта токсического действия различалась, практически, вдвое. Разница между нижней границей ЛД₅₀ и МПД для субстанции составила 8 мг/кг, а для лекформы, соответственно, 15 мг/кг.

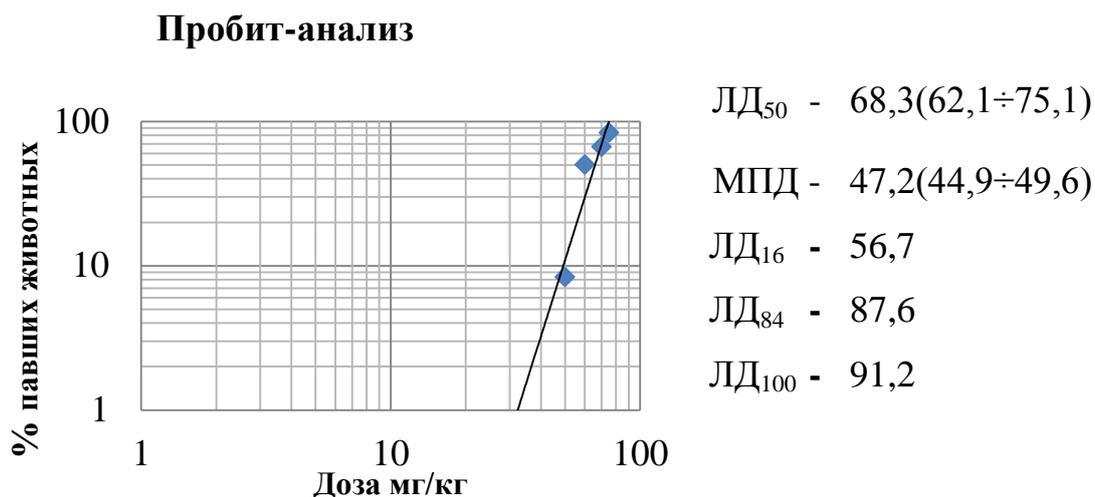


Рисунок 3. Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для лекарственной формы антрафурана при внутрибрюшинном введении мышам самкам BDF₁

3.1.3. Оценка острой токсичности антрафурана на крысах

Изучение острой токсичности ЛФ антрафурана на крысах при внутрибрюшинном применении показало, что клиническая картина, проявившаяся при определении токсических доз на мышах, характерна и для крыс. При этом широта токсического действия была весьма невелика. Параметры острой токсичности препарата представлены в таб. 4 и на рис. 4.

Таблица 4. Острая токсичность лекарственной формы антрафурана при внутрибрюшинном введении крысам самцам Wistar

Доза, мг/кг	Кол-во животных: пало/всего в группе	Сроки гибели
20	0/6	-
40	0/6	-
50	2/12	3 - 4 с
60	2/6	2 - 3 с
70	3/6	1 - 3 с
75	6/6	1 с
85	6/6	1 с

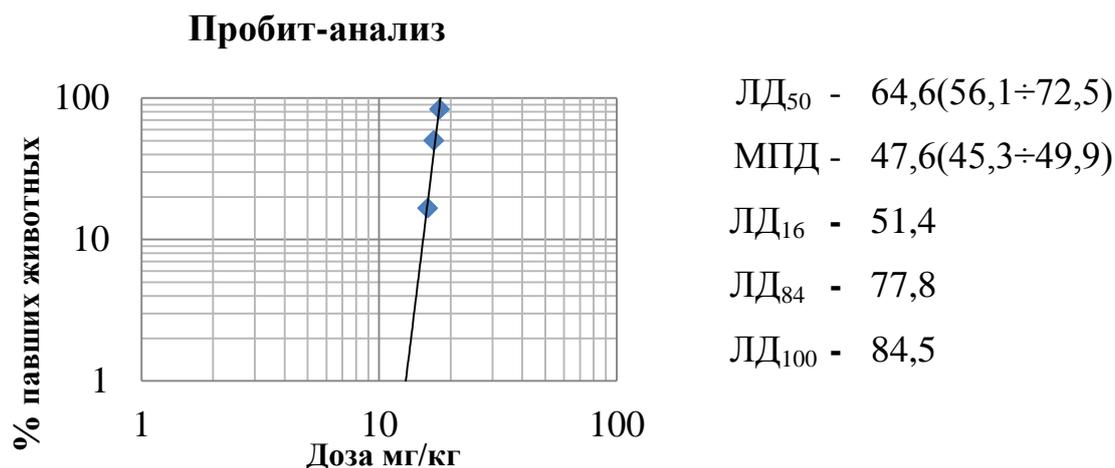


Рисунок 4. Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для лекарственной формы антрафурана при внутрибрюшинном введении крысам-самцам Wistar

3.2. Внутривенное введение

3.2.1. Оценка острой токсичности субстанции антрафурана на мышах *BDF₁*

Внутривенное введение антрафурана в виде субстанции в высоких смертельных дозах вызывало гибель животных «на игле» или в течение 10 – 15 минут после введения. Перед гибелью у животных развивались клонические судороги, дыхание резко учащалось, затем появлялось патологическое дыхание Чейн-Стокса, клонические судороги прекращались и возникали тонические судороги, затем животные принимали боковое положение, дыхание и сердечная деятельность прекращались. На вскрытии: сердце в систоле, лёгкие полнокровны, слизистая оболочка брюшной полости и кишечник бледно-розовая, сосуды расширены и наполнены кровью. Кровоизлияний и выпота в брюшную полость не наблюдалось.

Более низкие дозы препарата приводили к гибели животных в течение первых суток. При этом животные становились вялыми, принимали боковое положение, у них развивалось учащенное дыхание. Затем, дыхание становилось

слабым и наступало апноэ. При вскрытии павших животных обнаружено полнокровие органов брюшной полости и легких. Сердце в систоле. Полученные данные позволяют предположить, что причиной смерти животных является сердечно-сосудистая недостаточность, вызванная нейротоксическим действием.

Параметры острой токсичности субстанции препарата при внутривенном введении представлены в таб. 5 и на рис. 5.

Таблица 5. Острая токсичность субстанции антрафурана при внутривенном введении мышам самкам BDF₁

Доза (мг/кг)	Кол-во животных: пало/всего в группе	Срок гибели
3	0/6	-
4	1/6	1 сутки
5	2/6	10 – 15 минут
6	3/6	5 - 10 минут
7	4/6	5 – 7 минут
8	6/6	5 минут

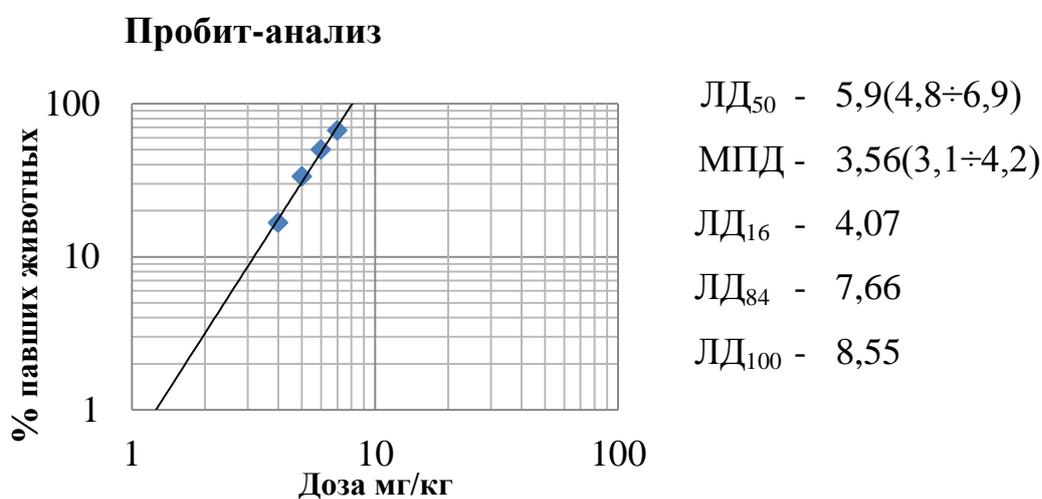


Рисунок 5. Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для субстанции антрафурана при внутривенном введении мышам самкам BDF₁

3.2.2. Оценка острой токсичности лекарственной формы антрафурана на крысах самцах Wistar

Клиническая картина интоксикации и гибели при внутривенном введении лекарственной формы антрафурана крысам была такой же, как у мышей. Параметры острой токсичности ЛФ препарата при внутривенном введении представлены в таб. 6 и на рис. 6.

Таблица 6. Острая токсичность лекарственной формы антрафурана при внутривенном введении крысам самцам Wistar

Доза (мг/кг)	Кол-во животных: пало/всего в группе	Срок гибели
15	0/6	-
16	1/6	1 сутки
17	3/6	30 минут – 1 час
18	5/6	5 - 10 минут
30	6/6	«на игле»

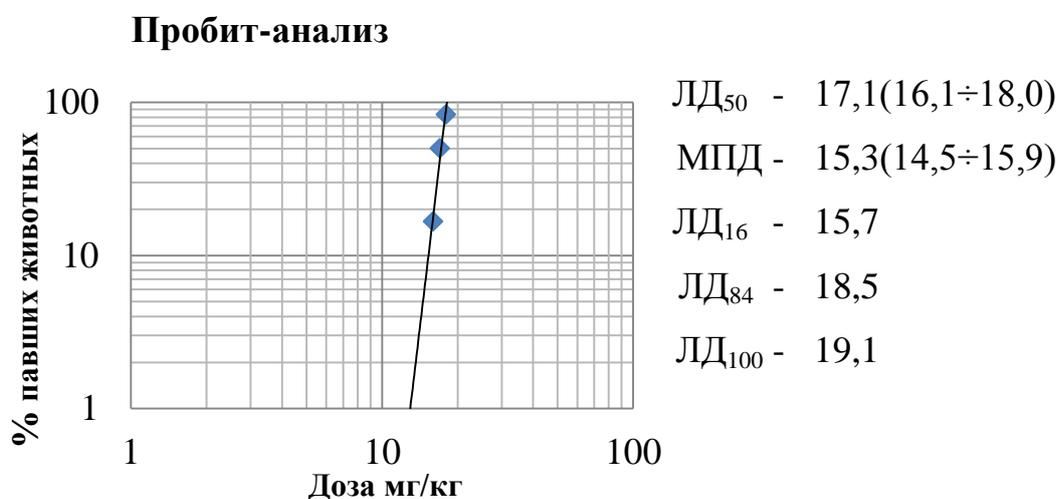


Рисунок 6 – Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для лекарственной формы антрафурана при внутривенном введении крысам самцам Wistar.

3.2.3. Оценка эффективности субстанции антрафурана

Для изучения эффективности антрафурана при внутривенном применении препарат вводили однократно в диапазоне доз, не превышающих МПД для данного пути введения мышам с в/б Р388. Из полученных результатов видно, что внутривенное применение антрафурана в диапазоне доз, не превышающих МПД, неэффективно (таб. 7).

Таблица 7. Средняя продолжительность жизни мышей с привитым внутрибрюшинно лейкозом Р388 при однократном внутривенном введении субстанции антрафурана в диапазоне доз.

Антрафуран доза, мг/кг	СПЖ (сутки) \pm ст. откл.
КРО	12,7 \pm 0,5
1мг/кг	12,5 \pm 0,5
2мг/кг	13 \pm 0,6
3мг/кг	12,8 \pm 1,0

Как видно из таблицы, СПЖ в группах антрафурана составила 12-13 суток, тогда как в группе контроля СПЖ 12,7 суток, т.е. противоопухолевый эффект отсутствует.

3.3. Заключение

Исследования эффективности и безопасности субстанции и лекарственной формы антрафурана при парентеральном применении показали следующее. Антрафуран в дозах от 10 до 30 мг/кг при ежедневном пятикратном введении (суммарно 50 и 150 мг/кг) вызывает достоверное увеличение средней продолжительности жизни мышей с лимфолейкозом Р-388 (Т/С=170-214%) при отсутствии асцита и поражения регионарных лимфоузлов. Однократные дозы антрафурана ≥ 40 мг/кг близки к токсическим. Расчетная максимально переносимая доза (МПД - 39,4 мг/кг) при внутрибрюшинном введении,

практически совпадает с минимальной дозой, вызывавшей лекарственную гибель в скрининговом эксперименте. Симптоматика и сроки гибели мышей позволяют предположить, что причиной смерти является нейротоксическое действие с клиническими проявлениями острой сердечно-сосудистой недостаточности. Токсические дозы, определённые при в/б введении субстанции и лекформы антрафурана мышам, практически одинаковы и не отличаются от токсических доз лекформы для крыс, что может указывать на отсутствие видовой специфичности. При в/в введении ЛФ антрафурана гибель животных наступала от чрезвычайно низких доз (4-8 мг/кг для мышей и 16-20 мг/кг для крыс) в сравнении с в/б применением (50-85 мг/кг для мышей и крыс). Переносимые в/в однократные дозы (1-3 мг/кг) были неэффективными на внутрибрюшинно привитом лейкозе Р388. Таким образом в/в путь введения антрафурана был отвергнут. Поскольку для антрациклинов эффективность перорального применения уже была доказана на примере препарата идарубицин [145], этот путь введения был выбран для продолжения доклинических исследований антрафурана.

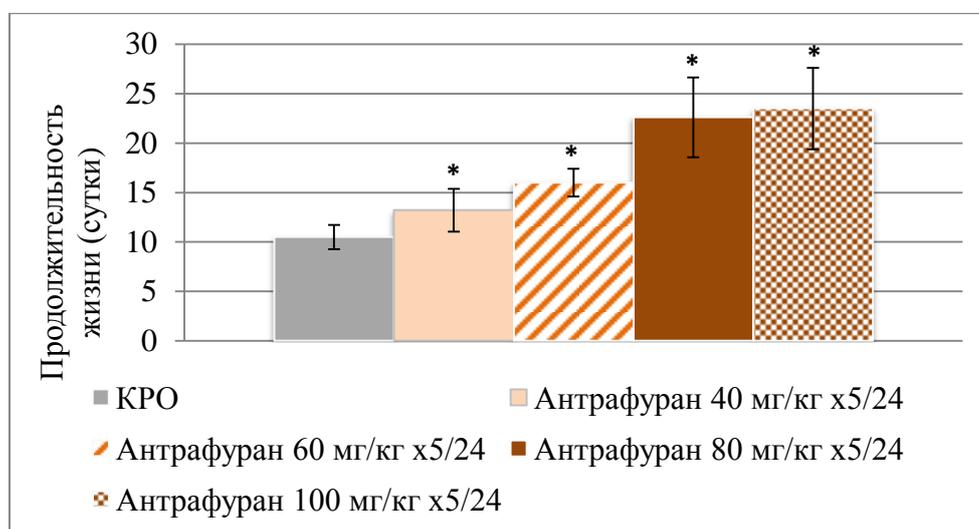
ГЛАВА 4. Изучение эффективности и безопасности антрафурана при пероральном введении

4.1. Эффективность антрафурана на скрининговых опухолевых моделях

4.1.1. Лимфолейкоз P388

Пероральное применение препарата в диапазоне разовых доз 40–60–80–100 мг/кг 5-кратно ежедневно (суммарно 200–300–400–500 мг/кг) было высокоэффективно и зависело от величины дозы. Соответственно, СПЖ=13,2±0,52–16,0±1,414–22,6±4,033–21,2±6,26 суток против группы КРО, где СПЖ=10,5±1,3 суток (Т/С=100%) (рис. 7 и таб. 8).

Увеличение выживаемости мышей достигало, соответственно, Т/С=126–152–215–224% ($p < 0,05$ от группы КРО). Достоверных различий между группами, получавшими терапию в разовых дозах 80 и 100 мг/кг, не выявлено.



*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$ (Для доверительных интервалов использовано стандартное отклонение)*

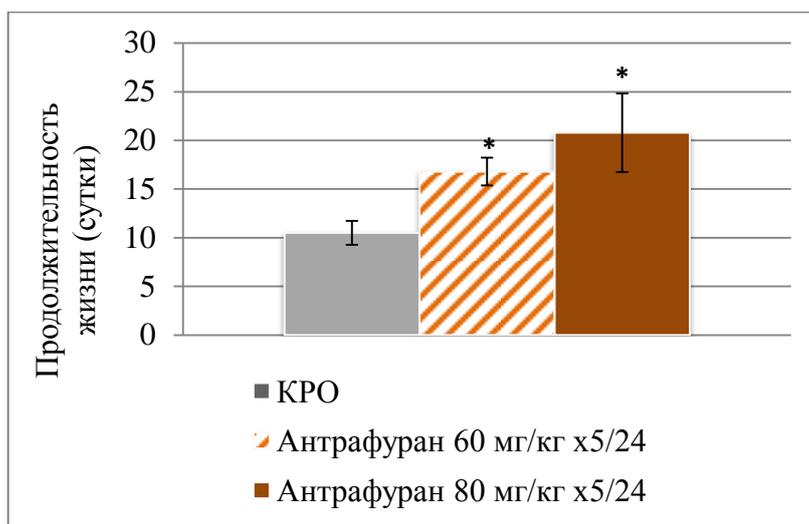
Рисунок 7. Средняя продолжительность жизни мышей при ежедневном 5-кратном (2-6 сутки) пероральном введении антрафурана мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом P388 в диапазоне доз.

В группе, получившей препарат в разовой дозе 100 мг/кг, наблюдалась гибель одной мыши на 12 день, тогда как в группе с предыдущей дозировкой гибель начиналась на 18 день (можно предположить лекарственную гибель).

Таблица 8. Соотношение Т/С% мышей при ежедневном 5-кратном (2-6 сутки) пероральном введении мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388 в диапазоне доз.

Группа	Доза (мг/кг)		Т/С (%)
	разовая	суммарная	
КРО	0,5 мл 5% ГЛЮКОЗЫ	2,5 мл 5% ГЛЮКОЗЫ	100
Антрафур ан	40	200	126
	60	300	152
	80	400	215
	100	500	224

Контроль воспроизводимости противоопухолевого эффекта выполнен с переносимыми эффективными разовыми дозами 60 и 80 мг/кг (суммарно 300 и 400 мг/кг). В результате получен достоверный противоопухолевый эффект с достижением СПЖ=16,8±3,24 дня и СПЖ=20,8±0,9 дня против СПЖ=9,3±0,52 в группе КРО. Соответственно, Т/С=181 и 223% ($p<0,05$) (рис. 8 и таб. 9). Гибели мышей от токсичности не наблюдали.



Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$

(Для доверительных интервалов использовано стандартное отклонение)

Рисунок 8 - Средняя продолжительность жизни мышей при ежедневном 5-кратном (2-6 сутки) пероральном введении антрафурана мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388 в диапазоне доз.

Таблица 9. Соотношение Т/С при ежедневном 5-кратном (2-6 сутки) пероральном введении мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388 в диапазоне доз.

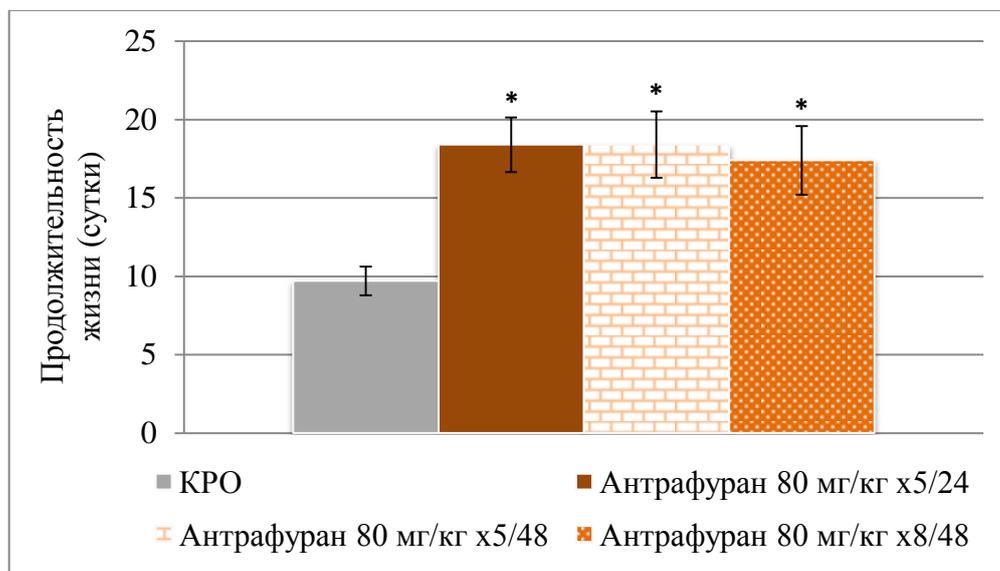
Группа	Доза (мг/кг)		Т/С (%)
	разовая	суммарная	
КРО	0,5 мл 5% ГЛЮКОЗЫ	2,5 мл 5% ГЛЮКОЗЫ	100
Антрафуран	60	300	181
	80	400	223

Таким образом, на мышах с Р388 выявлен достоверный воспроизводимый дозозависимый противоопухолевый эффект препарата при пероральном применении ежедневно 5-кратно в диапазоне разовых доз от 40 до 100 мг/кг. Рассчитанная по соотношению максимальной и минимальной эффективных доз терапевтическая широта составляет 5:1, оптимальная разовая доза - 80 мг/кг (суммарно 400 мг/кг), разовая доза 100 мг/кг близка к МПД.

Обработка оптимальной схемы перорального применения антрафурана выполнена при 5-ти или 8-кратном ежедневном введении с использованием оптимальной разовой дозы 80 мг/кг, введенной с интервалами 24 или 48 часов. Апробировано 3 схемы:

1. 80 мг/кг 5-кратно через 24 ч (суммарно 400 мг/кг)
2. 80 мг/кг 5-кратно через 48 ч (суммарно 400 мг/кг)
3. 80 мг/кг 8-кратно через 48 ч (суммарно 640 мг/кг)

Показано (рис. 9 и таб. 10), что в пределах суммарных доз 400–640 мг/кг уровень эффекта препарата был достоверно равновысоким и не зависел от кратности введения или суммарной дозы: СПЖ=18,4±1,74, СПЖ=18,4±2,12 и СПЖ=17,4±2,19 суток соответственно, против СПЖ=9,7±0,92 в группе КРО ($p < 0,05$).



*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$*

(Для доверительных интервалов использовано стандартное отклонение)

Рисунок 9. Средняя продолжительность жизни при различных схемах перорального введения антрафурана мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388.

Таблица 10. Соотношение Т/С при различных схемах перорального введения эффективных доз антрафурана мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388.

Группа	Доза, мг/кг			Т/С (%)
	Разовая	Схема (кол-во введений/ время между введениями)	Суммарная	
КРО	-	-	-	100
Антрафуран	80	5/24	400	190
	80	5/48	400	190
	80	8/48	640	179

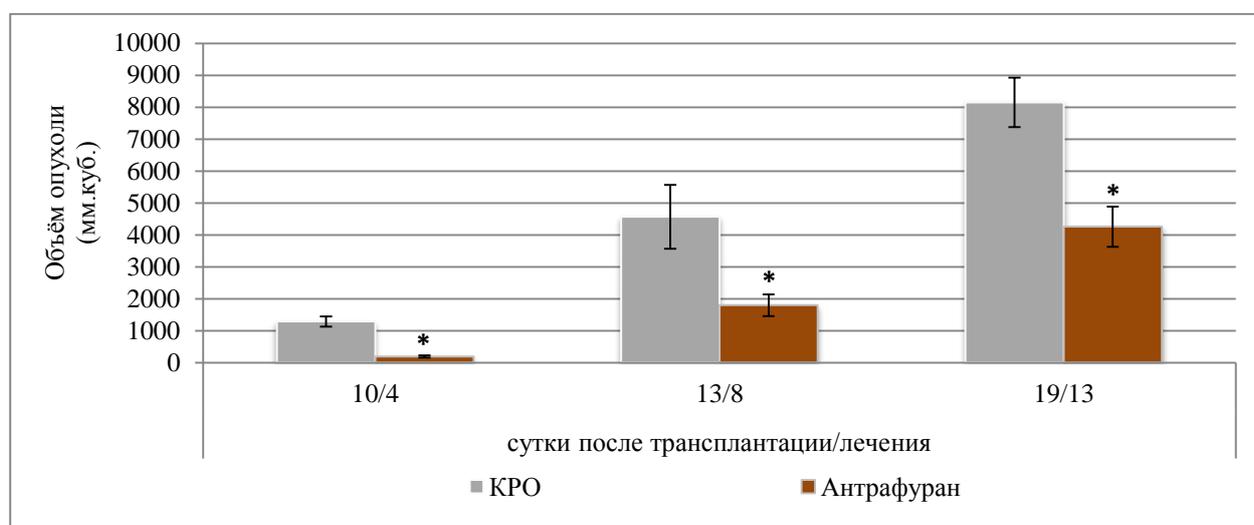
Увеличение выживаемости достигало, соответственно, Т/С=190–190–179% без достоверных различий между схемами.

В качестве оптимального режима перорального введения при изучении спектра противоопухолевого действия был отобран минимально достаточный ежедневный 5-кратный курс с оптимальной терапевтической разовой дозой 80 мг/кг.

4.1.2. Эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC)

Для солидной мышинной модели использована хорошо охарактеризованная разовая доза 80 мг/кг. Изучение выполнено на мышах с п/к трансплантированным LLC (n=13 в каждой группе). Антрафуран в оптимальной разовой дозе 80 мг/кг вводили ежедневно перорально на 3–7 сутки после трансплантации опухоли. Показано (таб. 11), что через 4 дня после окончания лечения (10-е сутки роста LLC) пальпируемые опухоли отсутствовали у 7 из 13 мышей, в то время как в группе КРО животные были с опухолями. У мышей с опухолями, появившимися одновременно с группой КРО (4-е, 8-е и 13-е с после лечения), объемы опухолевых узлов были достоверно меньше контрольных: $V_{ср}=194\pm 138$ мм³, $V_{ср}=1798\pm 1238$ мм³ и $V_{ср}=4260\pm 2268$ мм³ соответственно против $V_{ср}=1289\pm 492,7$ мм³, $V_{ср}=4565\pm 2998$ мм³ и $V_{ср}=8151\pm 2320$ мм³ в группе КРО

($p < 0,05$) (рис. 10). Расчет показателей эффективности с учетом отсутствия опухоли после окончания лечения («полная ремиссия», ПР), представлен в таб. 12. Как видно, у мышей с опухолями, выросшими одновременно с группой КРО, противоопухолевый эффект был значимым, достоверным и составил соответственно срокам наблюдения ТРО=84–61–48% ($p < 0,05$). ПР=54% регистрируется на значимом уровне сразу после окончания лечения более чем у половины мышей.



*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$*

(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)

Рисунок 10. Изменение объема опухолевых узлов солидной карциномы легкого Льюис под действием антрафурана, введенного перорально в оптимальной схеме.

Таблица 11. Эффективность антрафурана, введенного перорально в оптимальной схеме, в отношении эпидермальной карциномы легкого Льюис.

Сутки после трансплантации/лечения											
10/4				14/8				19/13			
ТРО%	n	ПР%	n	ТРО%	n	ПР%	n	ТРО%	n	ПР%	n
85	6/13	54	7/13	61	10/13	23	3/13	48	12/13	1	11/13

Примечания: n – число мышей с опухолью/число мышей в группе.

Таким образом, в рамках скрининга, выполненного на прогностически значимых опухолевых моделях P388 и LLC, показано, что антрафуран при многократном пероральном введении в широком диапазоне доз (соотношение максимальной и минимальной доз 5:1) высоко и достоверно активен. Диапазон терапевтических (переносимых) разовых доз, при ежедневном введении или введении через день, составляет 40–100 мг/кг. Активность воспроизводима в серии опытов. Оптимальной по кратности и длительности введения мышам с перевиваемыми опухолями оказалась схема с ежедневным 5-кратным курсом, а оптимальной разовой дозой 80 мг/кг (суммарно 400 мг/кг). Схемы с интервалом 48 ч между введениями или с 8-кратным курсом равноэффективны.

На P388 при терапевтических дозировках в прямой зависимости от величины разовой дозы выживаемость мышей достигает Т/С=126–223%, при оптимальной схеме Т/С=190-223% ($p < 0,05$).

На LLC оптимальной схеме терапии соответствует ТРО_{max}=84% ($p < 0,05$) с полной ремиссией (отсутствие опухоли) в течение 14 дней после окончания лечения, ПР_{max}=54% (n=13).

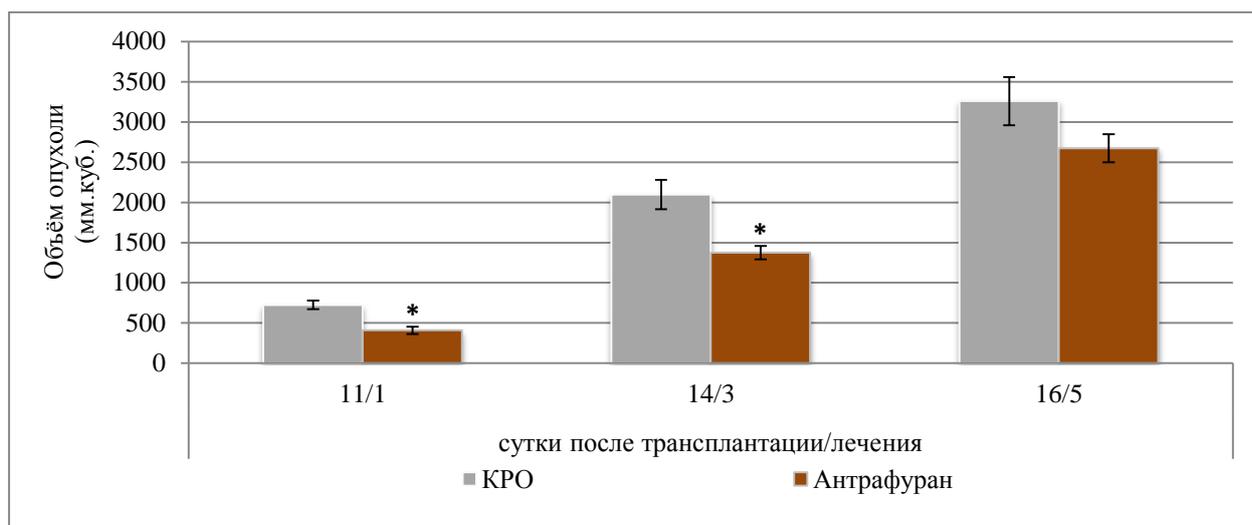
4.2. Эффективность антрафурана на модели рака молочной железы человека T47D при пероральном применении

Для проведения сравнительного исследования субстанции и лекарственной формы антрафурана на ксенографтах рака молочной железы человека T47D, привитых подкожно, был выбран режим 5-кратного введения с интервалом 48 часов в разовой дозе 80 мг/кг. Такая схема с введением агента в течение первых

10-ти дней роста опухоли (2–10 суток) позволяет максимально перекрыть выход опухоли в фазу экспоненциального роста опухоли (5–16 с) и контролировать ее активную стадию. Результаты представлены на рисунке 11 и в таблице 12.

4.2.1 Эффективность субстанции

В группе КРО опухолевые узлы Т47D (2-й пассаж, n=10) после трансплантации росли достаточно быстро (латентный период 3–5 дней) и в течение последующей недели увеличивались почти в 4 раза, что свидетельствует об экспоненциальном росте. На 11, 14 и 16-е с после трансплантации (сроки оценки эффективности в группе лечения) размеры опухолей составили, соответственно $V_{ср}=726\pm 181$ мм³, $V_{ср}=2097\pm 630$ мм³ и $V_{ср}=3259\pm 1037$ мм³. Применение субстанции антрафурана в сравнении с группой КРО достоверно, но слабо ингибировало рост опухоли в течение первых 3-х дней после окончания лечения. Сразу после терапии размеры опухолей достигли $V_{ср}=409\pm 162$ мм³ против $V_{ср}=726\pm 181$ мм³, соответственно T/C=56% (Tтест=0,0002), а на 3 сутки $V_{ср}=1375\pm 290$ мм³ против $V_{ср}=2097\pm 630$ мм³, соответственно T/C=66% (Tтест=0,0025) (критерий T/C \leq 42%). Далее достоверного ингибирования не отмечено (рис. 11). Мыши перенесли введение удовлетворительно, без побочных эффектов или гибели от токсичности.



Примечание: *различия с контролем достоверны, $p < 0,05$.

(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)

Рисунок 11. Динамика роста подкожных ксенографтов рака молочной железы человека T47D после 5-кратного перорального введения антрафурана (интервал 48 ч) в разовой дозе 80 мг/кг

Таблица 12. ТС% по среднему объёму ксенографтов рака молочной железы человека T47D после 5-кратного перорального введения антрафурана (интервал 48 ч) в разовой дозе 80 мг/кг

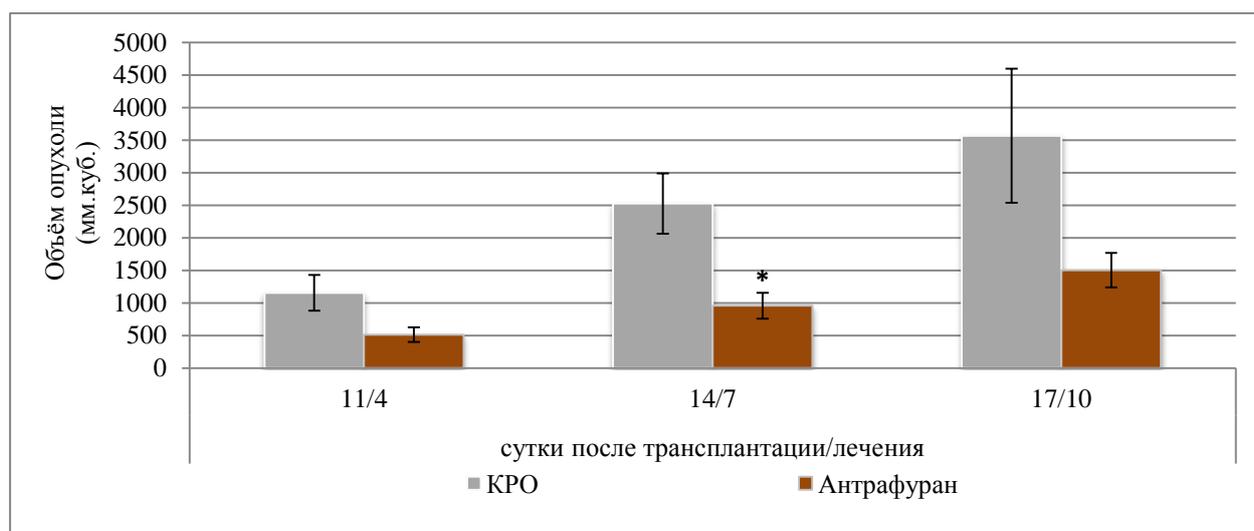
Группа	Сутки после трансплантации/лечения		
	11/1	14/3	16/5
КРО	100	100	100
Антрафуран 80мг/кг x5/48	56*	66*	82

Примечание: *различия с контролем достоверны, $p < 0,05$.

Таким образом, пероральное введение субстанции антрафурана в разовой дозе 80 мг/кг 5-кратно через 48 часов оказало слабый кратковременный, ниже порогового, но достоверный ингибирующий эффект, $T/C_{min} = 56\%$ ($p < 0,0002$) без побочных осложнений или гибели мышей от токсичности.

4.2.2 Эффективность лекарственной формы

В группе, получавшей антрафуран, на 7-е сутки после окончания лечения размеры опухолей были достоверно и значимо меньше, чем в группе контроля. Соответственно $V_{\text{ср}}=957\pm 442$ мм³ против $V_{\text{ср}}=2525\pm 1034$ мм³, Т/С=38% (Ттест=0,002). Эффект удерживался на значимом уровне в течение недели, Т/С=42%, (Ттест=0,12) (рис. 12, таб. 13).



*Примечание: *различия с контролем достоверны, $p < 0,05$.*

(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)

Рисунок 12. Динамика роста ксенографтов рака молочной железы человека T47D после 5-кратного (интервал 48 ч) введения лекарственной формы антрафурана в разовой дозе 80 мг/кг.

Таблица 13. ТС% по среднему объёму ксенографтов рака молочной железы человека Т47D после 5-кратного (интервал 48 ч) перорального введения антрафурана в разовой дозе 80 мг/кг

Группа	Сутки после трансплантации/лечения		
	11/4	14/7	17/10
КРО	100	100	100
Антрафуран 80мг/кг x5/48	44	38*	42

*Примечание: * - различия с контролем достоверны, $p < 0,05$.*

Таким образом, антрафуран в лекарственной форме достоверно и значимо ингибирует рост ксенографтов рака молочной железы человека Т47D на уровне Т/С=38–42% в режиме 5-кратного введения с интервалом 48 часов в разовой дозе 80 мг/кг, близкой к МПД для nude мышей.

По результатам исследований на опухолевых моделях мышей и человека антрафуран (субстанция и лекформа) охарактеризован как эффективный противоопухолевый препарат, перспективный для перорального применения.

4.3. Острая токсичность лекарственной формы при пероральном введении

4.3.1. Острая токсичность антрафурана на мышах

При пероральном применении ЛФ антрафурана гибель животных наступала, в основном, на 3-5 сутки на фоне явлений кишечной токсичности (диспепсия, снижение массы тела) и 7-10 сутки, что характерно для гематологической токсичности.

Таблица 14. Острая токсичность лекарственной формы антрафурана при пероральном введении мышам самкам BDF₁.

Доза, мг/кг	Кол-во животных: пало/всего в группе	% павших
100	0/6	0
200	1/6	16,6
300	3/6	50
400	5/6	83,3
600	6/6	100

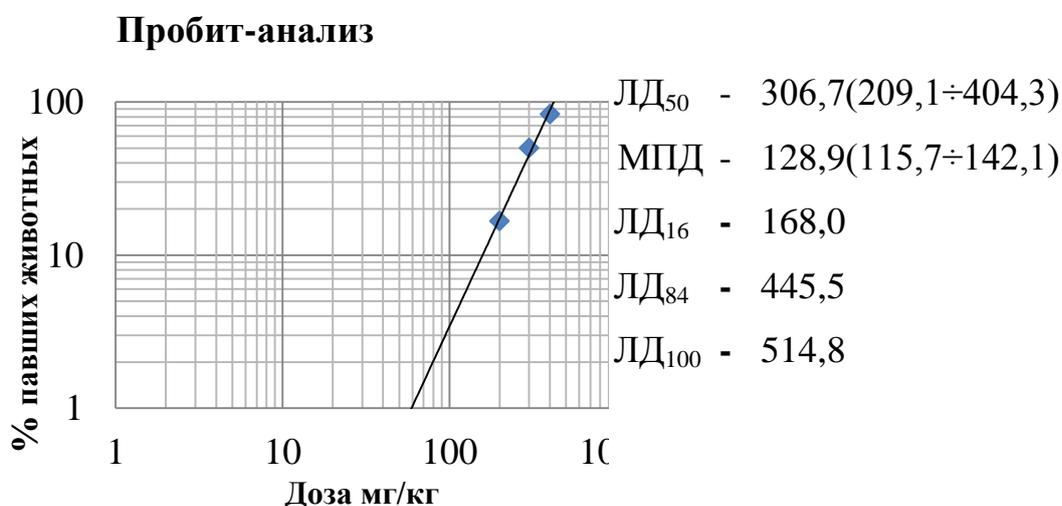


Рисунок 13. Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для лекарственной формы антрафурана при пероральном введении мышам самкам BDF₁.

4.3.2. Острая токсичность антрафурана на крысах

При пероральном применении ЛФ антрафурана у крыс гибель наступала в те же сроки, что и у мышей: на 3-5 сутки на фоне явлений кишечной токсичности (диспепсия, снижение массы тела) и 7-10 сутки, по-видимому, от гематологической токсичности (Таб. 15).

Таблица 15. Острая токсичность лекарственной формы антрафурана при пероральном введении крысам самцам Wistar.

Доза, мг/кг	Кол-во животных: пало/всего в группе	% павших
100	0/6	0
200	0/6	0
300	2/6	33,3
400	4/6	66,6
500	5/6	83,3
600	6/6	100

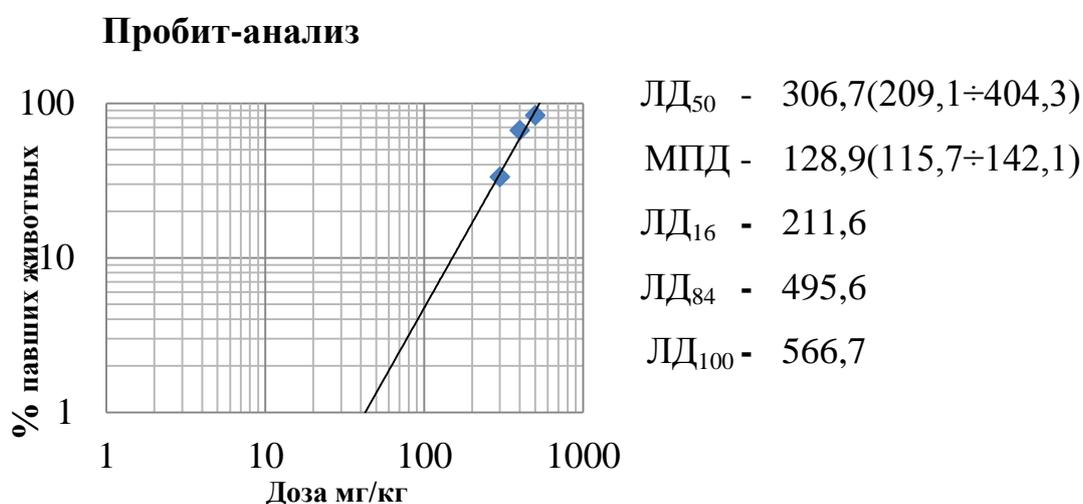


Рисунок 14. Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для лекарственной формы антрафурана при пероральном введении крысам самцам Wistar.

Таким образом, исследования эффективности и безопасности антрафурана при пероральном пути введения показали, что препарат проявляет выраженное достоверно высокое противоопухолевое действие на опухолевых моделях мышей и человека.

При пероральном пути введения токсичность препарата по параметрам LD₅₀ и МПД уменьшается в 3-5 раз по сравнению с внутрибрюшинным. Изменяются механизмы и сроки гибели животных: пероральное применение вызывает гибель

мышей и крыс от 3 до 10 суток при явлениях гастроинтестинальной и гематологической токсичности, в отличие от внутрибрюшинного пути введения, когда гибель наступает в течение 1 суток на фоне сердечно-легочной недостаточности, обусловленной нейротоксичностью препарата. Все это позволяет оценить пероральный путь введения как оптимальный и продолжить углубленные токсикологические исследования антрафурана в качестве потенциального противоопухолевого средства в виде лекарственной композиции для приема внутрь.

ГЛАВА 5. Изучение особенностей повреждающего действия антрафурана при длительном пероральном применении

Как известно, характеристика повреждающего действия фармакологического вещества при его длительном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, а также исследование возможности обратимости вызываемых повреждений оценивается в хронических токсикологических исследованиях [130]. Для решения этих задач в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств были проведены субхронические эксперименты на двух видах животных – крысах и кроликах. Оценка токсикологических характеристик субстанции антрафурана была проведена на крысах, лекарственной формы – на кроликах. На основании результатов исследования эффективности антрафурана, которые обосновали режим 5-кратного ежедневного введения в терапевтической дозе как оптимальный для реализации противоопухолевого действия препарата, продолжительность субхронического изучения составила 2 недели.

5.1. Субхроническая токсичность антрафурана на крысах при пероральном применении

При проведении исследований на крысах субстанцию антрафурана вводили в желудок при помощи шприца со специальным металлическим зондом ежедневно на протяжении 15 дней в разовых дозах, составляющих 20 мг/кг (1 терапевтическая доза) и 100 мг/кг (5 терапевтических доз). При расчете разовых доз для крыс исходили из терапевтических доз для мышей, пересчитанных через коэффициент поверхности тела [144].

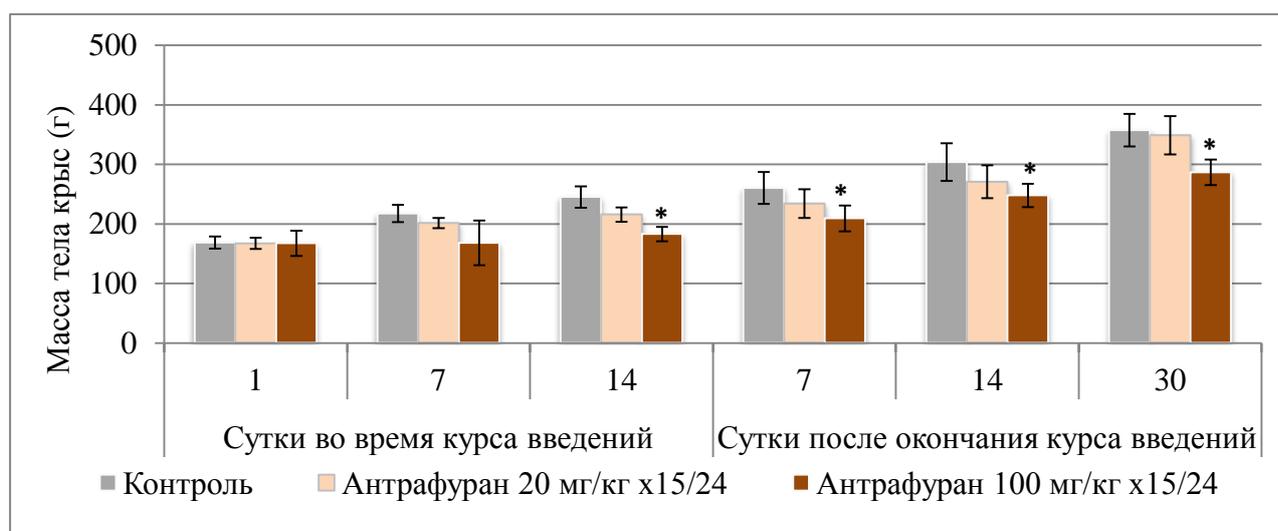
5.1.1. Клинические и лабораторные показатели

Смертность животных. Во время курса введений антрафурана в дозе 20 мг/кг животные не погибали. После 10-го введения препарата в дозе 100 мг/кг

пали 2 крысы из 10-ти в группе. По окончании курса введений ни в одной группе в течение 30 суток гибели отмечено не было.

Состояние, поведение и динамика массы тела животных. На всем протяжении эксперимента отклонений в поведенческих реакциях животных (беспокойство, агрессивность, вялость) не отмечено. У крыс сохранялся гладкий шерстный покров, мышечный тонус менялся соответственно возрасту. Ни в одном случае не отмечено явлений мидриаза и экзофтальмии. Переносимость препарата при применении в 1 ТД была удовлетворительной, животные прибавляли в массе тела соответственно возрасту.

К окончанию курса введений антрафурана в разовой дозе, составляющей 5 терапевтических, было отмечено замедление прироста массы тела, которое сохранялось до конца наблюдения (Рис. 15).



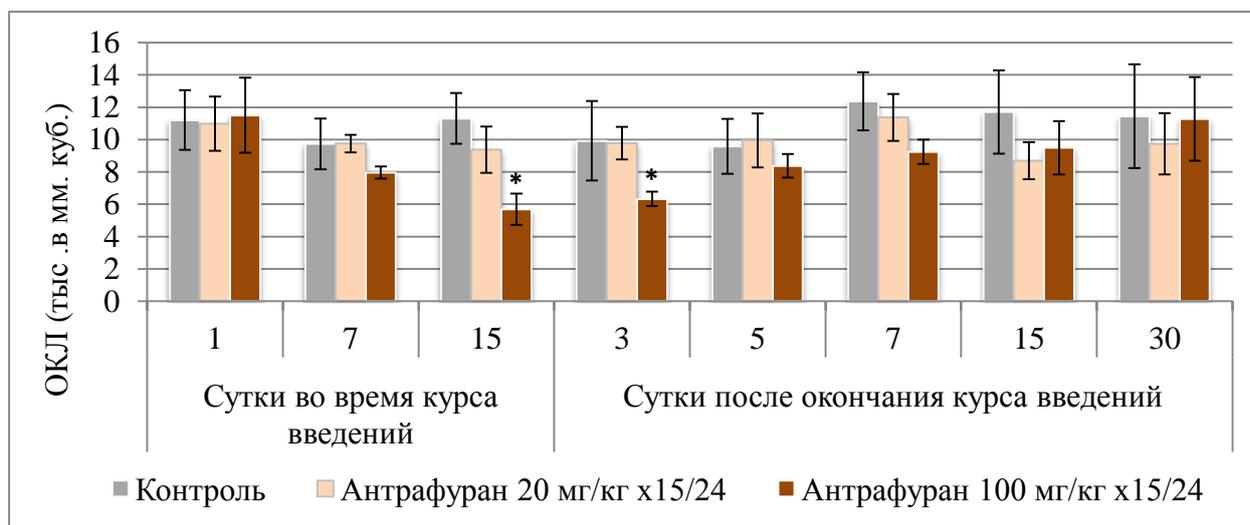
*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p \leq 0,05$
(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)*

Рисунок 15. Динамика массы тела крыс.

Потребление корма и воды. Двухнедельное введение препарата в испытанных дозах не оказывало статистически значимого влияния на потребление крысами корма и воды.

Состояние слизистых оболочек (нос, глаза), кожи, подкожной жировой клетчатки и волосяного покрова. Двухнедельное ежедневное введение препарата в диапазоне доз не оказывало влияния на состояние кожи, видимых слизистых оболочек и волосяного покрова крыс. Видимые слизистые оболочки оставались бледно-розового цвета, обычной влажности, симптомы конъюнктивита, ринита или бронхита отсутствовали.

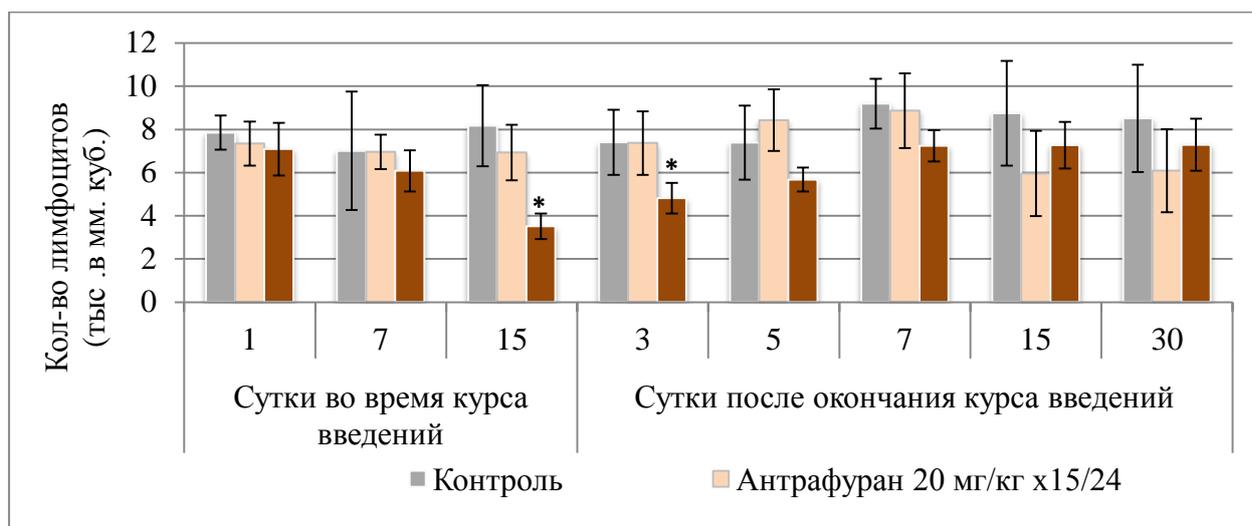
Количественное исследование клеток периферической крови. После 14 введения антрафурана (15-е сутки курса) в дозе 100 мг/кг и через 3 дня по окончании курса было выявлено достоверное уменьшение общего количества лейкоцитов (ОКЛ) до 5 – 6 тыс/мм³ (Рис. 16).



*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p < 0,05$
(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)*

Рисунок 16. Динамика общего количества лейкоцитов в периферической крови крыс.

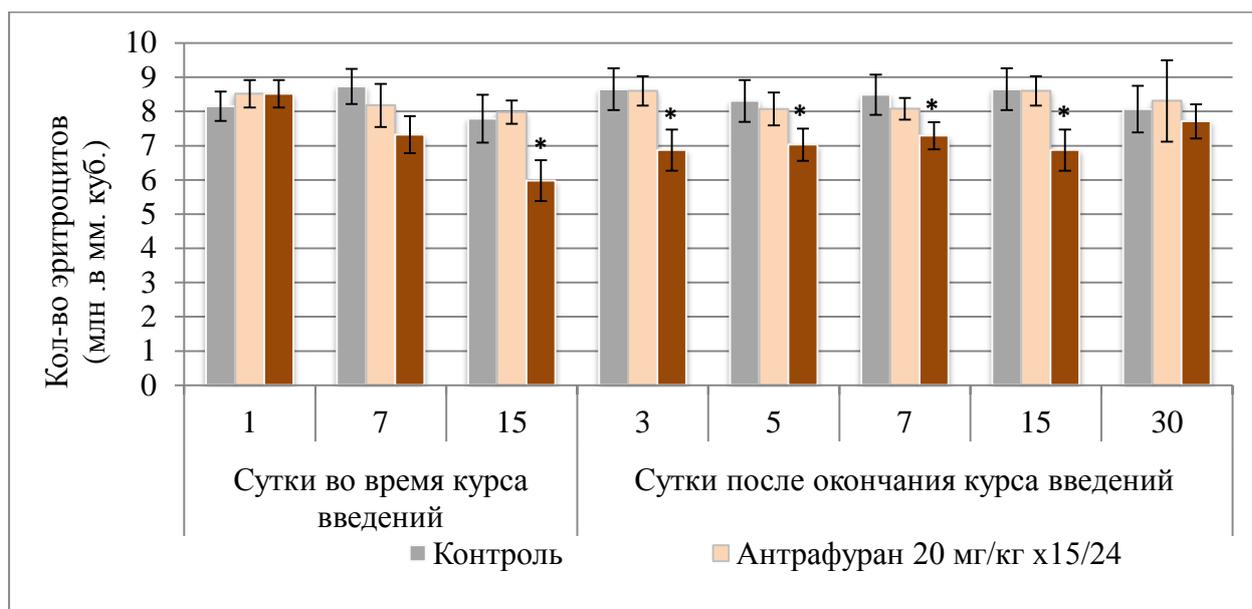
Уменьшение ОКЛ происходило за счёт лимфоцитов (рис. 17). Лимфоцитопения наблюдалась в те же сроки эксперимента, что и снижение общего количества лейкоцитов.



*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p < 0,05$
(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)*

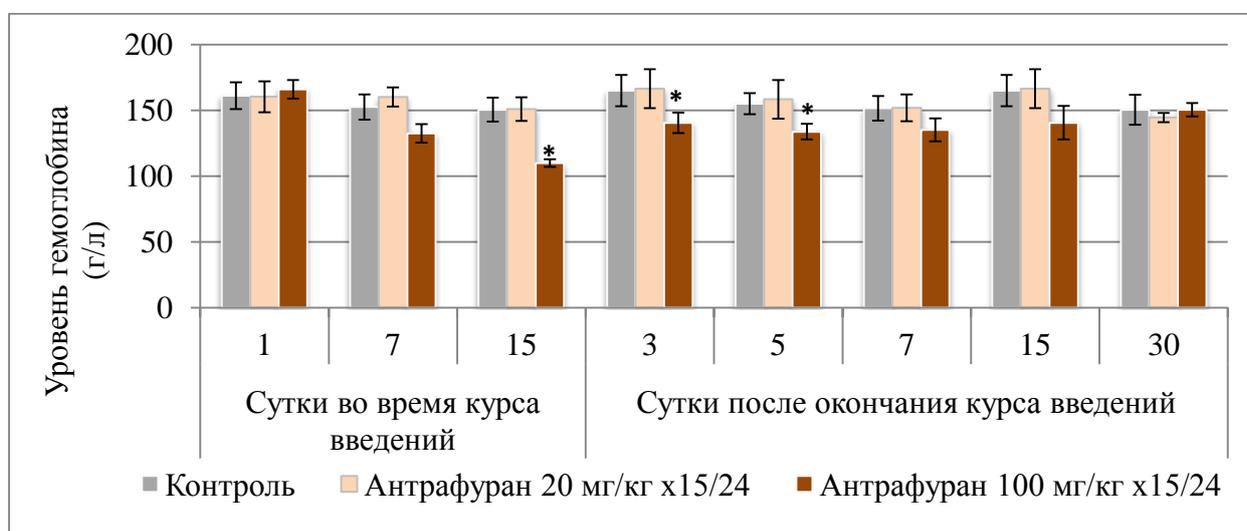
Рисунок 17. Динамика количества лимфоцитов в периферической крови крыс.

Снижение количества эритроцитов и уменьшение содержания гемоглобина было зарегистрировано после 7 введения, величины гематокрита – на 1 сутки по окончании введения препарата и сохранялось до 30 суток эксперимента (Рис. 18 – 20). К концу наблюдения эти показатели восстанавливались до уровня интактного контроля. Количество тромбоцитов оставалось в пределах физиологической нормы. При применении препарата в дозе 20 мг/кг достоверных изменений клинической картины крови не обнаружено.



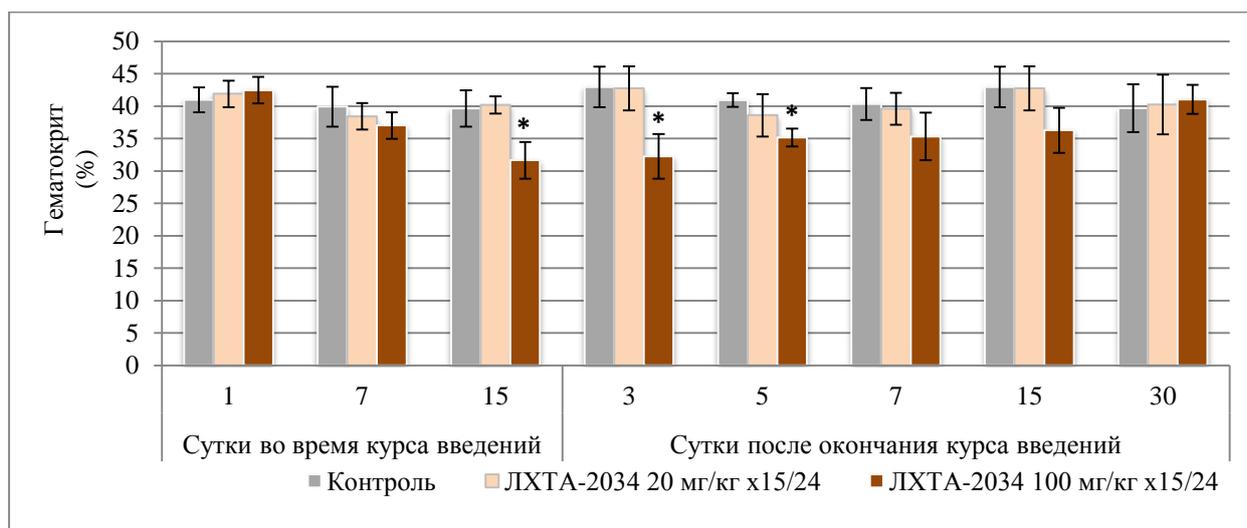
*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p < 0,05$
(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)*

Рисунок 18. Динамика количества эритроцитов в периферической крови крыс.



*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p < 0,05$
(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)*

Рисунок 19. Динамика содержания гемоглобина в периферической крови крыс



*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p < 0,05$
(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)*

Рисунок 20. Динамика величины гематокрита в периферической крови крыс **Биохимическое исследование крови.** В сыворотке крови на 1 и 30 сутки после окончания введений препарата патологических изменений не выявлено.

Суточный диурез и состав мочи. При клиническом исследовании мочи у животных, получавших антрафуран в 1 ТД, была отмечена гематурия, которая проявилась на 1 сутки после курса введений препарата. У животных, получавших высокую дозу антрафурана, в моче, помимо эритроцитов, были найдены нитраты. Гематурия и нитратурия была обнаружена сразу по окончании курса и сохранялась в течение месяца (Таб. 16).

Таблица 16. Клинический анализ мочи крыс

Показатели	Контроль	20 мг/кг	100 мг/кг
1 сутки после курса			
Выпито (мл)	14,8 ± 2,6	12,0 ± 4,4	16,3 ± 1,9
Выделено (мл)	13,0 ± 3,0	10,4 ± 4,4	12,8 ± 2,6
Кровь	Нег.	*50±20	*250±50
Лейкоциты (лей/мкл)	Нег.	Нег.	Нег.
Билирубин	Нег.	Нег.	Нег.
Убг.	Норм.	Норм.	Норм.
Кетоновые тела	Нег.	Нег.	Нег.
Глюкоза (ммоль/л)	Нег.	Нег.	Нег.
Белок (г/л)	0,3	0,48 ± 0,26	0,3
pH	6,5	6,5	6,5
Нитраты	Нег.	Нег.	Пол.
Удельный вес	1,020 ± 0,01	1,020 ± 0,01	1,020 ± 0,01
30 сутки после курса			
Выпито (мл)	15,8 ± 3,7	14,0 ± 3,4	14,3 ± 3,2
Выделено (мл)	14,2 ± 2,9	12,9 ± 4,2	12,7 ± 3,1
Кровь	Нег.	Нег.	*250±50
Лейкоциты (лей/мкл)	Нег.	Нег.	Нег.
Билирубин	Нег.	Нег.	Нег.
Убг.	Норм.	Норм.	Норм.
Кетоновые тела	Нег.	Нег.	Нег.
Глюкоза (ммоль/л)	Нег.	Нег.	Нег.
Белок (г/л)	0,1	0,3 ± 0,12	0,3
pH	6,5	6,5	6,5
Нитраты	Нег.	Нег.	Пол.
Удельный вес	1,020 ± 0,01	1,020 ± 0,01	1,020 ± 0,01

Примечание: * различия с контролем достоверны, $p < 0,05$

Сердечно-сосудистая система и массовые коэффициенты внутренних органов. При изучении сердечно-сосудистой системы подопытных животных отклонений от нормы не обнаружено.

Массовые коэффициенты (МК) внутренних органов животных, получавших антрафуран, не отличались от контроля, за исключением тимуса, уменьшение массы которого было выявлено в группе, получавшей препарат в дозе, равной 5ТД (Таб. 17).

Таблица 17. Массовые коэффициенты внутренних органов крыс

Группа	Показатель	Тимус	Сердце	Селезенка	Почка	Печень
1 сутки после курса						
Контроль	ср.зн.	0,19	0,31	0,36	0,31	3,99
	ст.откл.	0,04	0,03	0,05	0,02	0,27
20 мг/кг	ср.зн.	0,16	0,33	0,36	0,32	4,03
	ст.откл.	0,04	0,03	0,04	0,02	0,51
100 мг/кг	ср.зн.	*0,10	0,35	0,33	0,38	4,52
	ст.откл.	0,04	0,05	0,04	0,09	0,61
30 сутки после курса						
Контроль	ср.зн.	0,18	0,32	0,35	0,32	4,07
	ст.откл.	0,03	0,02	0,04	0,03	0,31
20 мг/кг	ср.зн.	0,17	0,33	0,36	0,33	0,12
	ст.откл.	0,03	0,03	0,04	0,04	0,54
100 мг/кг	ср.зн.	0,14	0,34	0,34	0,35	4,29
	ст.откл.	0,01	0,03	0,04	0,04	0,37

Примечание: * различия с контролем достоверны, $p < 0,05$

5.1.2. Патоморфологическое исследование

Изучение патологических изменений внутренних органов крыс под действием антрафурана показало, что препарат, примененный перорально ежедневно в течение двух недель в разовой дозе, эквивалентной 1 ТД, вызывает морфологические изменения разной степени выраженности в печени, почках, сердце, желудке, тощей и подвздошной кишке, селезенке и тимусе. При курсовом введении препарата в дозе, превышающей терапевтическую в 5 раз, помимо перечисленных органов, повреждающему действию подвергаются также лимфоузлы, поджелудочная железа, толстая кишка и мозг.

При применении антрафурана в 1 ТД повреждение ткани печени проявлялось в виде мелких очагов некроза в различных зонах (фото 1а - контроль, 1б).

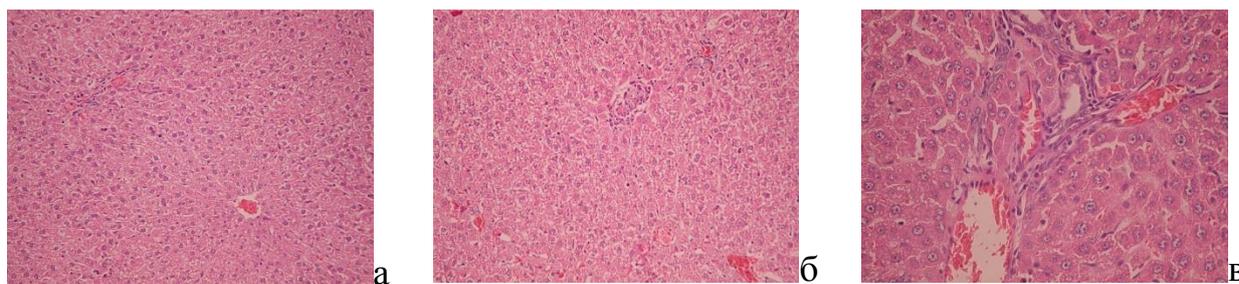


Фото 1. Печень крысы. а – интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 20 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Очаг микронекроза вблизи портального тракта. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 30 сутки после курса. Жировая дистрофия гепатоцитов вблизи триады. х 40

В почках на фоне сильного периваскулярного отека встречались единичные мелкие очаги некроза извитых канальцев, которые локализовались вокруг сосудов и клубочков корковой зоны (Фото 2а – контроль, 2б).

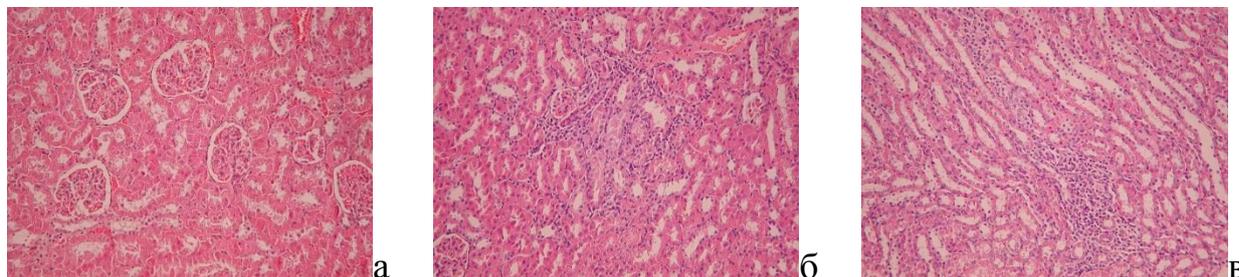


Фото 2. Почка крысы. а – интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 20 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Очаг некроза извитых канальцев вблизи клубочка и сосуда. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Очаг некроза прямых канальцев в мозговой зоне. х 20

В сердце морфологические изменения выражались в полнокровии сосудов миокарда (Фото 3а – контроль, 3б).

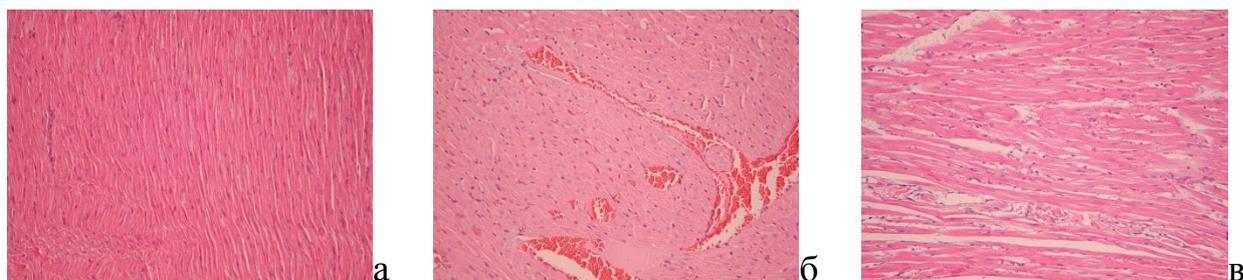


Фото 3. Миокард крысы. а – интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 20 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Резкое полнокровие капилляров и венул. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 30 сутки после курса. Отек, очаги атрофии мышечных волокон. х 20

Реакция слизистой оболочки желудочно-кишечного канала на пероральное введение препарата проявлялась в виде гиперемии, отека и очаговой деструкции клеточных элементов поверхностных слоев. Так, в желудке отмечалось резкое полнокровие капилляров, атрофия или деструкция покровно-ямочного эпителия и обкладочных клеток, умеренная атрофия слизистой оболочки (Фото 4а – контроль, 4б).

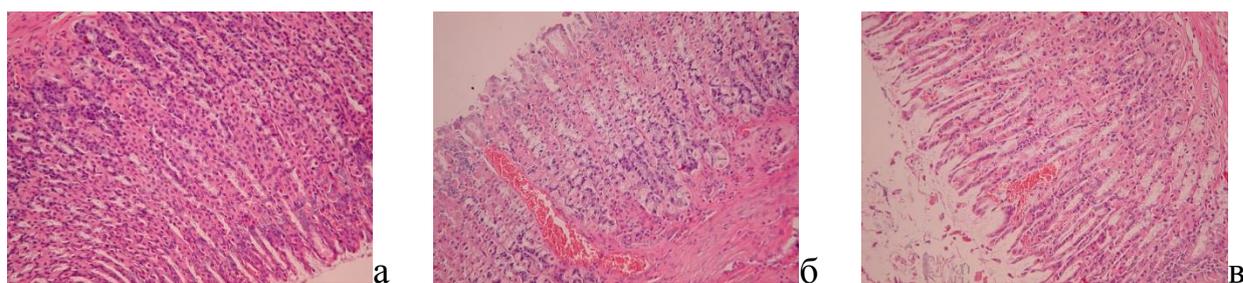


Фото 4. Желудок крысы. а – интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 20 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Умеренная атрофия слизистой оболочки, деструкция обкладочных клеток и покровно-ямочного эпителия, полнокровие капилляров. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Глубокая атрофия эпителия желез, атрофия, деструкция и десквамация покровно-ямочного эпителия, деструкция обкладочных клеток. х 20

Воздействие антрафурана на структуру селезенки выражалось в умеренной атрофии лимфоидной ткани фолликулов, тимуса – в умеренной атрофии лимфоидной ткани в корковой и мозговой зоне отдельных долек. Все эти явления были полностью обратимы в течение месяца.

Пятикратное превышение терапевтической дозы вызывало намного более глубокие повреждения в органах и тканях, а иногда изменялся и их характер. Так, в печени, наряду с некрозом ткани, был выявлен апоптоз единичных гепатоцитов. Через месяц после курса введений деструктивные изменения в печени отсутствовали, но в отдельных клетках появлялись дистрофические (фото 1в).

При 5-кратном увеличении разовой дозы антрафурана резко усиливалось повреждающее действие препарата на ткань почек: очаги некроза канальцев возникали не только в корковой зоне, но и в других зонах почки (фото 2в). В отдельных клубочках юкстамедуллярной зоны появлялись очаги деструкции капилляров. В течение месяца структура почек восстанавливалась, единичные очаги деструкции подвергались организации.

Применение высокой дозы антрафурана приводило как к гемодинамическим нарушениям, так и к очаговому повреждению миокарда, приводящему у отдельных животных через месяц после курса к атрофии небольших групп мышечных волокон (фото 3в).

При курсовом пероральном введении высокой дозы также отмечалось усиление повреждающего действия препарата на слизистую оболочку желудочно-кишечного канала. В желудке к деструктивным изменениям покровно-ямочного эпителия присоединялась глубокая атрофия слизистой оболочки, которая сохранялась до конца наблюдения (фото 4в). В тощей и подвздошной кишке усиливалась гиперемия, отек и увеличивался объем ткани, подвергающейся деструкции. В течение месяца структура слизистой оболочки тощей кишки восстанавливалась, в подвздошной сохранялись признаки атрофии. Появлялись умеренно выраженные воспалительные реакции в толстой кишке, которые в слабой форме сохранялись до конца эксперимента.

При введении препарата в высокой дозе на 30 сутки по окончании курса были обнаружены обширные очаги некроза вокруг сосудов и протоков экзокринной части поджелудочной железы (фото 5а – контроль, 5б). Несмотря на то, что эти изменения были выявлены только у 1 животного, они заслуживают особого внимания, т.к. затрагивают не только ацинусы, но и отдельные желчные протоки, а также сопровождаются деструкцией клеток островков Лангерганса, расположенных в зоне некроза.

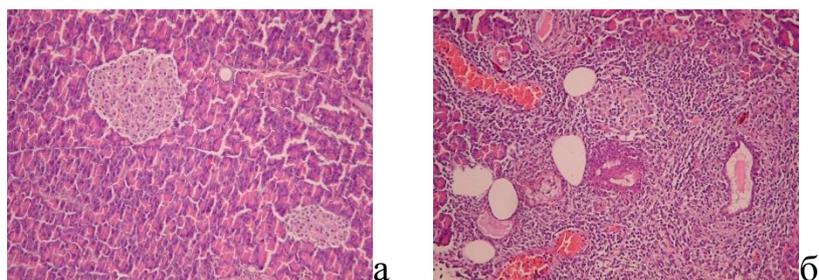


Фото 5. Поджелудочная железа крысы. а – интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 30 сутки после курса. Очаг некроза ацинусов. Некроз желчных протоков. Кисты на месте деструкции протоков. Деструкция клеток в островке Лангерганса. х 20

Применение препарата в высокой дозе вызывало атрофию лимфоидной ткани. В лимфоузлах она была выражена умеренно. В селезенке глубокая атрофия сопровождалась активацией экстрамедуллярного кроветворения, в отдельных долях тимуса она приобретала характер аплазии. Если структура селезенки лимфоузлов восстанавливалась полностью, то в отдельных долях тимуса регенерация лимфоидной ткани происходила на фоне склеротических изменений стромы.

Изучение структуры мозга позволяет утверждать, что при использовании в высоких дозах препарат преодолевает гематоэнцефалический барьер, вызывая токсическую энцефалопатию, морфологические признаки которой наблюдались в сером и белом веществе больших полушарий и мозжечке. Сразу после курса

введений антрафурана они проявлялись в виде полнокровия сосудов мягкой мозговой оболочки и белого вещества, перикапиллярного отека в сером веществе, дегенеративных изменений отдельных пирамидных нейронов (фото ба – контроль, бб).

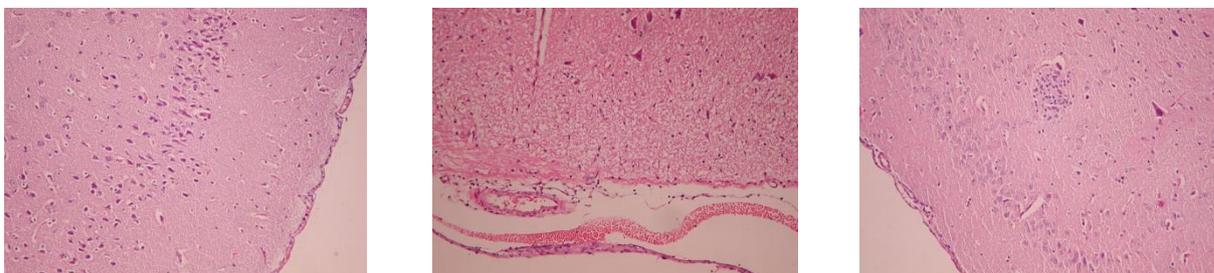


Фото 6. Мозг крысы. Большое полушарие. а - интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Набухание и разрыхление мягкой мозговой оболочки, вакуолизация нейропилия молекулярного слоя, отек вокруг капилляров наружной пирамидной пластинки, клетки-тени на месте пирамидных нейронов. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Клетки астроглии на месте пирамидных нейронов, микроглиальный узелок в наружной зернистой пластинке, уменьшение количества пирамидных нейронов во внутренней пирамидной пластинке. х 20

Через месяц после прекращения введений были зарегистрированы кровоизлияния в мягкой мозговой оболочке больших полушарий и мозжечка. Развивалась диффузная атрофия мозговых структур серого вещества, которая выражалась в дегенеративных изменениях нейронов, замещении наружного слоя пирамидных нейронов клетками астроглии, формировании микроглиальных узелков в наружной зернистой пластинке, уменьшении количества пирамидных нейронов во внутренней пирамидной пластинке (фото бв). Наиболее тяжелые изменения локализовались в сером и белом веществе затылочной области.

В мозжечке препарат вызывал дегенерацию, разрежение, а на отдельных участках и выпадение клеток Пуркинью (фото 7 – контроль, 7а), которое, по-видимому, компенсировалось их очаговой гиперплазией (фото 7в).

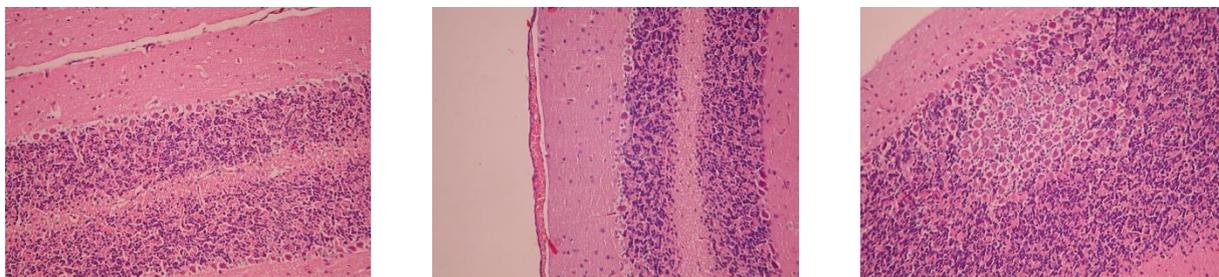


Фото 7. Мозжечок крысы. а - интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Полнокровие капилляров мягкой мозговой оболочки. Разрежение и дегенерация отдельных клеток Пуркинью. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 30 сутки после курса. Очаг гиперплазии клеток Пуркинью. х 20

Заключение. Проведенные исследования показали, что ежедневное пероральное 15-кратное введение исследуемого препарата в разовой дозе, составляющей 1 терапевтическую, хорошо переносится животными и не вызывает их гибели. Они нормально прибавляют в массу тела, состояние кожи, слизистых оболочек и волосяного покрова не изменяются, что свидетельствует об отсутствии у препарата ярко выраженного общетоксического действия. Превышение терапевтической дозы в 5 раз приводит к гибели части животных.

Гематотоксические свойства антрафурана при курсовом введении в 1ТД выражены умеренно и регистрируются только при изучении структуры лимфоидных органов. При применении препарата в высокой дозе снижение общего количества лейкоцитов в периферической крови регистрируется к концу курса введений, а к 5 суткам после курса возвращается к нормальным значениям. Оно происходит за счёт относительной лимфоцитопении. Лимфотоксическое действие препарата подтверждается атрофическими изменениями лимфоидной

ткани селезенки, лимфоузлов и тимуса, а также уменьшением массового коэффициента тимуса.

Применение антрафурана в разовой дозе, составляющей 5ТД, приводит к развитию эритроцитопении, уменьшению содержания гемоглобина и снижению гематокрита. Восстановление этих показателей происходит в течение 1 - 2 недель после курса.

Гастроинтестинальная токсичность антрафурана по критерию прироста массы тела выявляется при введении препарата в высокой дозе. Отставание прироста массы тела развивается к концу курса введений и сохраняется до конца наблюдения. При патоморфологическом исследовании найдены изменения в желудке и отделах кишечника, интенсивность которых зависит от дозы антрафурана.

Гепатотоксичность препарата проявляется только морфологически. Пятикратное превышение терапевтической дозы антрафурана изменяет не только интенсивность, но и характер повреждений, вызывая наряду с некрозом ткани, апоптоз единичных гепатоцитов.

Нефротоксическое действие антрафурана клинически выражается в виде гематурии и нитратурии и определяется в обеих подопытных группах. При 5-кратном превышении терапевтической дозы она сохраняется до конца наблюдения. По данным патоморфологического исследования 5-кратное превышение терапевтической дозы приводит к повреждению не только канальцевой, но и клубочковой системы почек.

Кардиотоксические свойства антрафурана установлены только по результатам патоморфологического исследования миокарда животных, получавших препарат в высокой дозе. Повреждающее действие препарата на ткань сердца проявляется на поздний срок наблюдения.

Изучение структуры мозга позволяет утверждать, что при использовании в высоких дозах препарат преодолевает гематоэнцефалический барьер, вызывая токсическую энцефалопатию.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что функциональные и морфологические изменения, возникающие под действием антрафурана, зависят от величины примененной дозы. При курсовом введении препарата в дозе, эквивалентной 1 терапевтической, они полностью обратимы в течение 30 дней. Особенностью токсического действия препарата является его способность проникать через гематоэнцефалический барьер. Морфологически она проявляется только при многократном использовании высокой дозы соединения.

5.2. Субхроническая токсичность антрафурана на кроликах при пероральном применении

На кроликах была изучена субхроническая токсичность лекарственной формы антрафурана, которую в желатиновых капсулах вводили в желудок ежедневно на протяжении 15 дней. Содержание препарата в капсулах рассчитывали индивидуально для каждого животного. Дозы для исследования были выбраны на основании изучения острой токсичности препарата на крысах и, в соответствии с методическими рекомендациями, суммарно составляли МПД и ЛД₅₀. Разовые дозы равнялись 2 и 6 мг/кг соответственно.

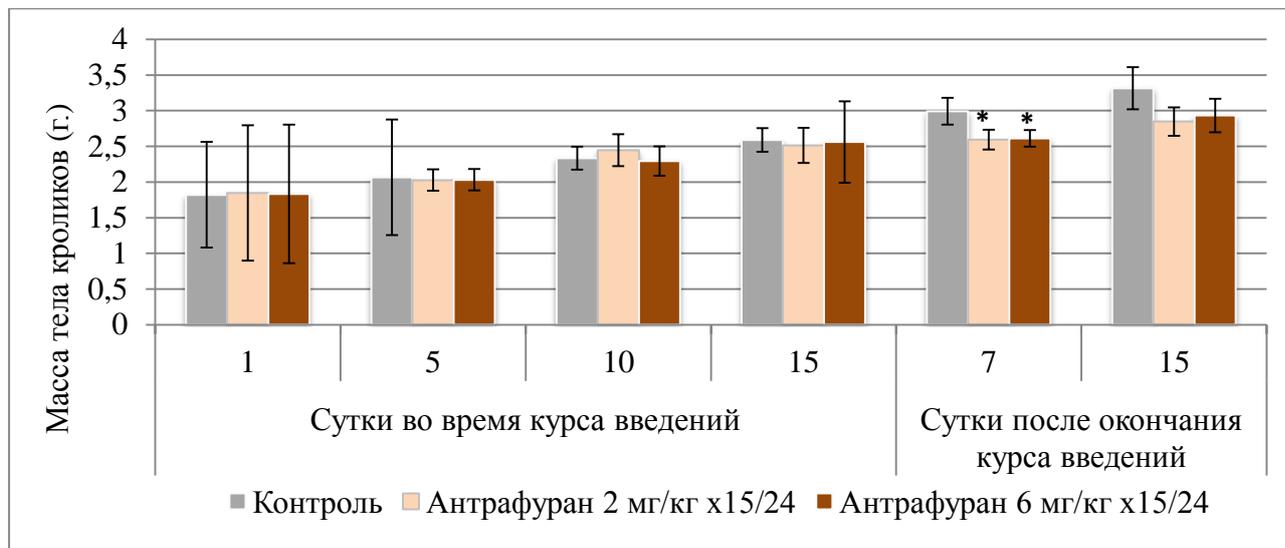
5.2.1. Клинические и лабораторные показатели

Смертность животных. Во время введения в течение 15 суток, так же как и в течение 15 суток после прекращения приёма препарата, гибели кроликов не наблюдалось ни в одной из групп.

Состояние, поведение и динамика массы тела животных. На всем протяжении эксперимента отклонений в поведенческих реакциях животных не отмечалось. Животные не становились беспокойными, агрессивными или вялыми. У них соответственно возрасту изменялся мышечный тонус, сохранялся гладкий шерстный покров. Ни в одном случае не было отмечено явлений мидриаза и экзофтальмии.

На 7 сутки после окончания введений препарата в обеих подопытных группах была отмечена задержка прироста массы тела по сравнению с контролем.

На 15 сутки после курса масса тела подопытных животных не отличалась от контроля (Рис. 19).



*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p < 0,05$
(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)*

Рисунок 19. Динамика массы тела кроликов.

Потребление корма и воды. Двухнедельное введение препарата в испытанных дозах не оказывало статистически значимого влияния на потребление кроликами корма и воды.

Состояние слизистых оболочек (нос, глаза), кожи, подкожной жировой клетчатки и волосяного покрова. Ежедневное введение антрафурана в лекарственной форме в течение 15 дней в изученных дозах не оказывало влияния на состояние кожи и видимых слизистых оболочек. У подопытных кроликов слизистые оболочки оставались бледно-розового цвета, влажность их не изменялась, симптомы бронхита, конъюнктивита и ринита отсутствовали. Изменений подкожной жировой ткани и волосяного покрова не выявлено.

Количественное исследование клеток периферической крови. При исследовании общего количества лейкоцитов в периферической крови кроликов подопытных и контрольной групп существенных различий не отмечено. Колебания этих показателей не выходили за пределы физиологической нормы.

Изменений морфологического состава лейкоцитов, общего количества эритроцитов и содержания гемоглобина, показателя гематокрита, количества тромбоцитов не обнаружено ни в одной из групп.

Биохимическое исследование крови. При биохимическом исследовании сыворотки крови, проведенном на 1 сутки после окончания введений препарата, выявлено повышение активности АЛТ и АСТ в обеих подопытных группах. На 15 сутки после окончания курса введений отклонений от контроля не обнаружено (Таб. 18).

Таблица 18. Активность АЛТ и АСТ в сыворотке крови кроликов.

Группа	Доза (мг/кг) и режим	АЛТ (Ед/л)	АСТ (Ед/л)
1 сутки после окончания курса			
Антрафуран	2x15/24	*100,9 ± 10,5	*126,2 ± 25,8
Антрафуран	6x15/24	*112,1 ± 27,7	*154,2 ± 3,4
контроль	-	69,3 ± 14,1	61,1 ± 13,8
15 сутки после окончания курса			
Антрафуран	2x15/24	88,9 ± 18,0	61,0 ± 15,7
Антрафуран	6x15/24	61,1 ± 12,7	46,3 ± 14,4
контроль	-	74,8 ± 7,5	80,3 ± 9,0

*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p < 0,05$
(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)*

Клинический анализ мочи. При исследовании клинического анализа мочи на 1 сутки после курса обнаружено увеличение содержания уробилиногена, кетонов и белка и уменьшение удельного веса мочи до 1,0 в обеих подопытных группах. К концу наблюдения показатели анализа мочи подопытных животных не отличались от контроля (Таб. 19).

Таблица 19. Клинический анализ мочи кроликов.

Группа	Эритроциты (мкл)	Лейкоциты (мкл)	Уробилиноген (мкмоль/л)	Кетоны (ммоль/л)	Белок (г/л)	Удельный вес
1 сутки после курса						
Антрафуран 2x15/24	НЕГ	НЕГ	*17,0	*0-0,5	*5	*1,00
Антрафуран 6x15/24	НЕГ	НЕГ	*17,0	*0-0,5	*5	*1,00
контроль	НЕГ	НЕГ	НОРМ	НЕГ	≤0,33	1,02
15 сутки после курса						
Антрафуран 2x15/24	0-10	НЕГ	НОРМ	НЕГ	0,53 ±0,4	1,020 ±0,003
Антрафуран 6x15/24	НЕГ	НЕГ	НОРМ	НЕГ	0,53 ±0,4	1,010 ±0,01
контроль	НЕГ	НЕГ	НОРМ	НЕГ	≤0,33	1,015 ±0,005

Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p < 0,05$

Сердечно-сосудистая система и массовые коэффициенты внутренних органов. Электрокардиографическое исследование состояния сердечно-сосудистой системы подопытных животных отклонений от нормы не показало.

При вскрытии животных макроскопических изменений внутренних органов не обнаружено. У животных, получавших препарат в высокой дозе, на 1 сутки после курса было выявлено достоверное уменьшение МК тимуса и увеличение МК печени. Других отличий от контроля не выявлено (Таб. 20).

Таблица 20. Массовые коэффициенты тимуса и печени кроликов

Группа	Тимус	Печень
1 сутки после курса		
Антрафуран 2 мг/кг x 15/24	0,16±0,08	3,90±0,77
Антрафуран 6 мг/кг x 15/24	*0,14±0,03	*7,53±1,20
Контроль	0,21±0,02	3,67±1,34
15 сутки после курса		
Антрафуран 2 мг/кг x 15/24	0,16±0,04	2,47±0,47
Антрафуран 6 мг/кг x 15/24	0,16±0,09	2,61±0,17
Контроль	0,15±0,05	2,44±0,22

*Примечание: * – различия с контролем достоверны, $p < 0,05$
(Для доверительных интервалов использована стандартная ошибка)*

5.2.2. Патоморфологическое исследование

Изучение патологических изменений внутренних органов кроликов под действием антрафурана показало, что препарат, примененный перорально ежедневно в течение 15 дней в дозе, суммарно составляющей МПД, вызывает морфологические изменения разной степени выраженности в печени, почках, сердце и тимусе. При курсовом введении препарата в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀, помимо перечисленных органов, повреждающему действию подвергаются также двенадцатиперстная кишка, селезенка, лимфоузлы и щитовидная железа.

При введении антрафурана в разовой дозе 2 мг/кг в течение 15 дней на 1 сутки после курса в печени кроликов была выявлена вакуольная дистрофия гепатоцитов вокруг центральных вен (фото 8б). Вблизи триад были найдены единичные мелкие очаги микронекроза, вокруг отдельных желчных протоков – умеренная лимфогистиоцитарная инфильтрация (фото 8в). На 15 сутки по окончании введений препарата структура печени не отличалась от контроля.

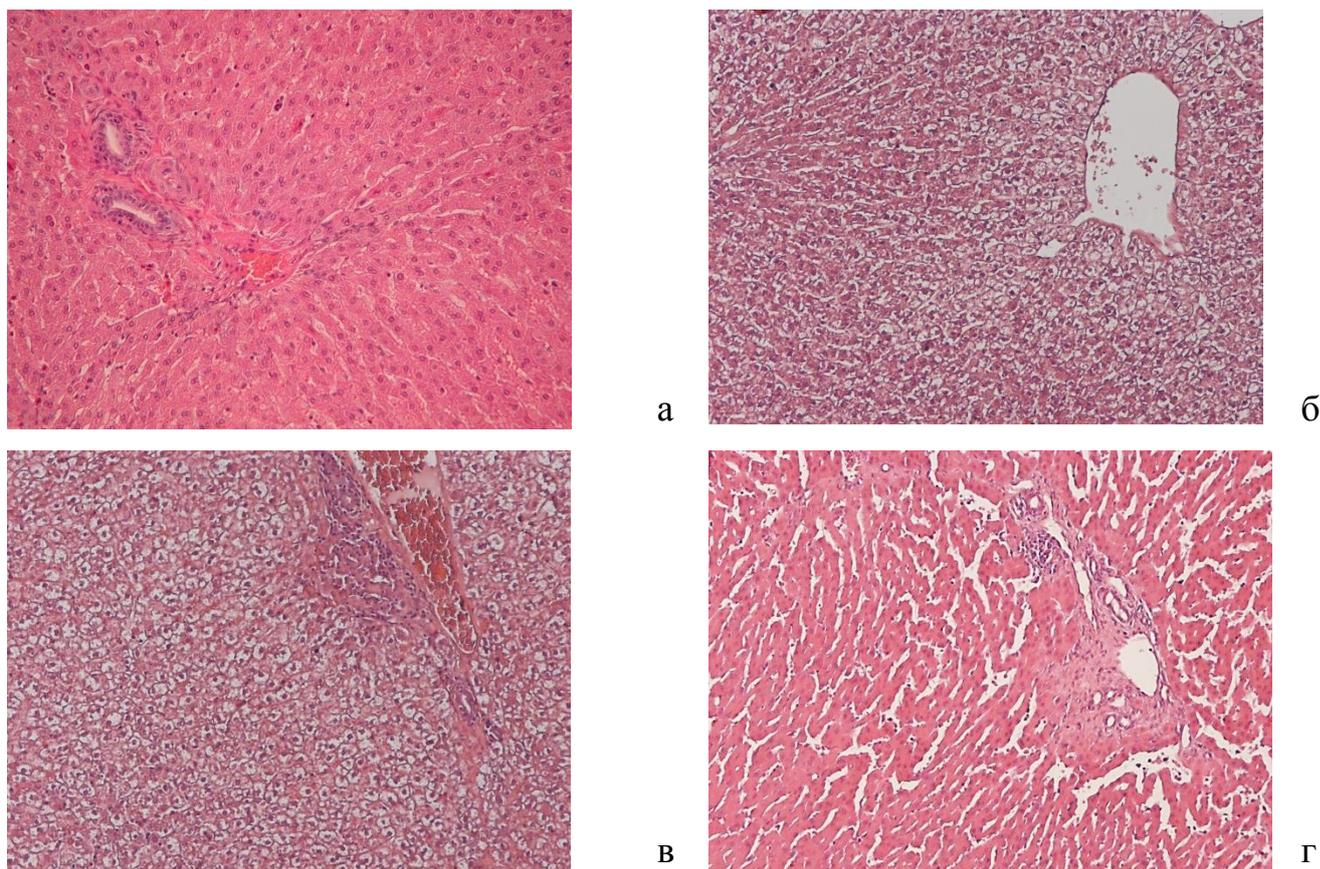


Фото 8. Печень кролика. а – контроль. б - Антрафуран 2 мг/кг x 15. 1 сутки после курса. Вакуольная дистрофия гепатоцитов вокруг центральной вены. x 20; в - Антрафуран 6 мг/кг x 15. 1 сутки после курса. Тотальная вакуольная дистрофия гепатоцитов. Очаг микронекроза вблизи триады. x 20; г - Антрафуран 6 мг/кг x 15. 15 сутки после курса. Отек, очаг микронекроза, гиперплазия желчных протоков, фиброз вокруг триады. x 20

При применении антрафурана в дозе, суммарно составляющей МПД, на 1 сутки после курса введений в корковой зоне были найдены единичные очаги вакуольной дистрофии и деструкции извитых канальцев (фото 9в). В отдельных прямых канальцах мозговой зоны встречались гиалиновые цилиндры и клеточный детрит (фото 9г). К концу наблюдения структура органа не отличалась от контроля.

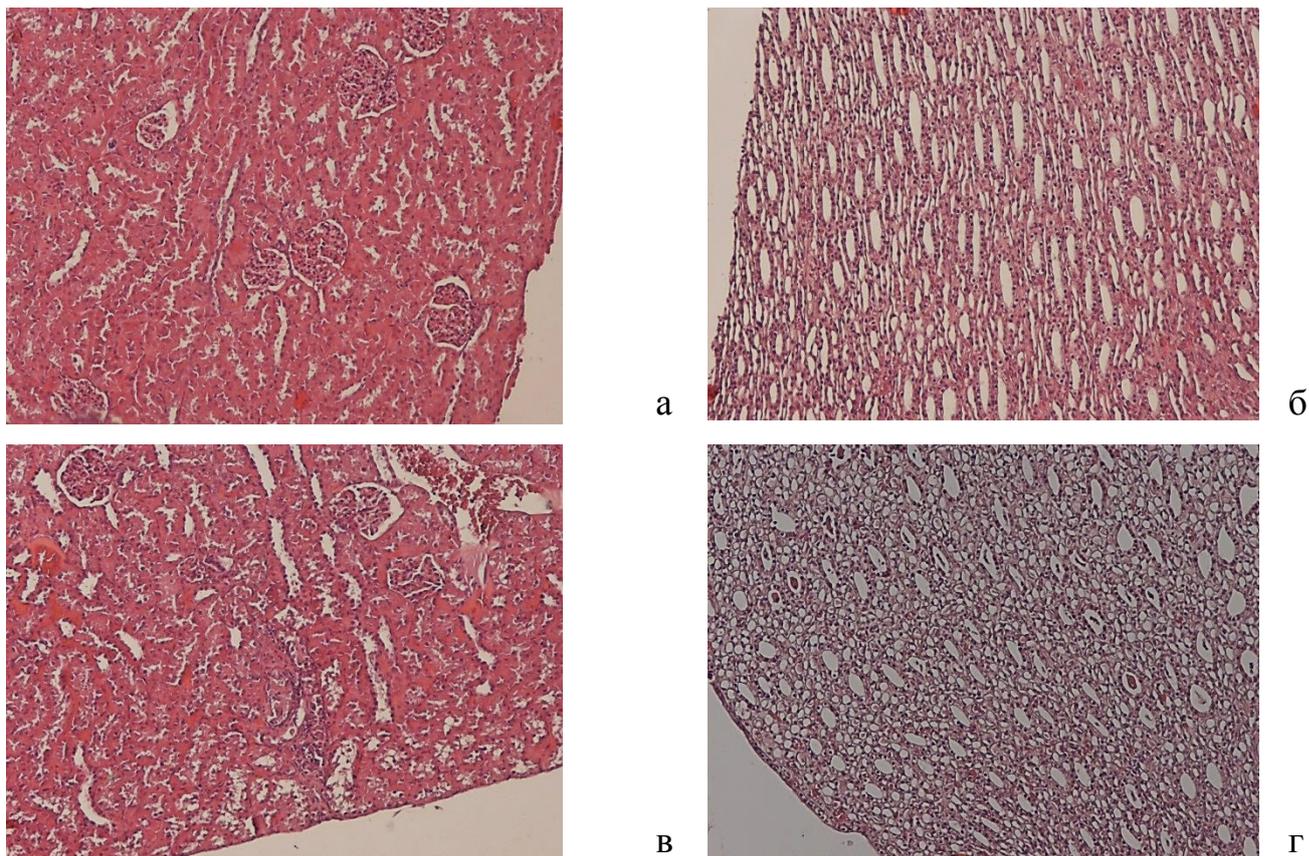


Фото 9. Почки кролика. а – контроль, корковая зона. х 20; б - контроль, мозговая зона. х 20; в - Антрафуран 2 мг/кг х 15. 1 сутки после курса. Корковая зона. Очаги деструкции эпителия извитых канальцев. х 20; г - Антрафуран 2 мг/кг х 15. 1 сутки после курса. Мозговая зона. Гиалиновые цилиндры и клеточный детрит в прямых канальцах. х 20

При применении препарата в разовой дозе 2 мг/кг на 1 сутки после курса в миокарде были выявлены единичные мелкие очаги токсической кардиомиопатии (фото 10б). На 15 сутки по окончании введений строение сердечной мышцы не отличалось от контроля.

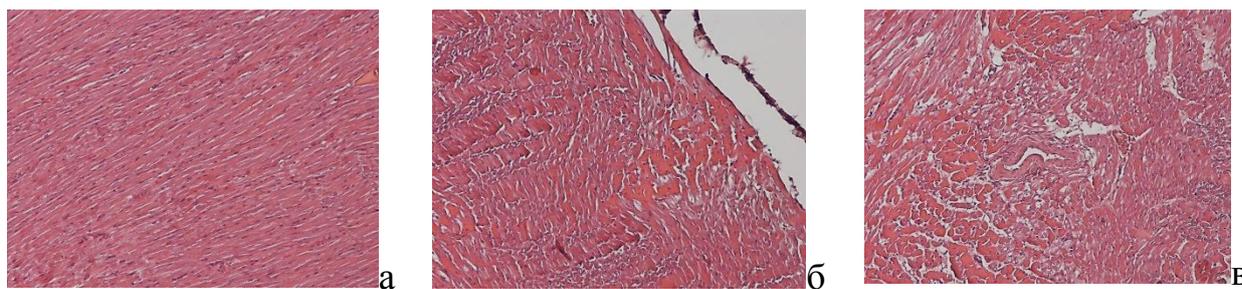


Фото 10. Сердце кролика. а – контроль. х 20; б - Антрафуран 2 мг/кг х 15. 1 сутки после курса. Очаг токсической кардиомиопатии. х 20; в - Антрафуран 6 мг/кг х 15. 15 сутки после курса. Крупные очаги отека и токсической кардиомиопатии вблизи артерии. х 20

Пятнадцатикратное введение препарата в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀, вызывает намного более глубокие повреждения в органах и тканях. Так, в печени, вакуольная дистрофия гепатоцитов приобретает тотальный характер, увеличиваются размеры очагов микронекроза и изменяется их локализация, появляются признаки повреждения желчных протоков (Фото 8г). Через 2 недели структура печени частично восстанавливается. В ряде случаев повреждение желчных протоков завершается их гиперплазией и фиброзом окружающей ткани.

В почке применение антрафурана в суммарной дозе, эквивалентной ЛД₅₀, приводило к возникновению сильного периваскулярного отека в корковой и юкстамедуллярной зоне. Во всех зонах были выявлены множественные мелкие очаги некроза или деструкции эпителия извитых и прямых канальцев (фото 11а).

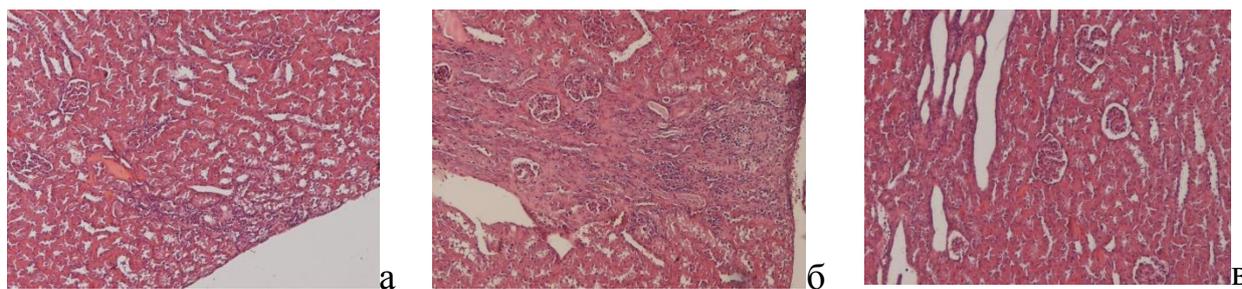


Фото 11. Почка кролика. Антрафуран 6 мг/кг х 15. а – 1 сутки после курса. Кортикальная зона. Очаги деструкции эпителия извитых канальцев. х 20; б - 15 суток после курса. Кортикальная зона. Обширная зона некроза канальцев в стадии организации. х 20; в - 15 суток после курса. Юкстамедуллярная зона. Кисты, выстланные плоским эпителием, на месте поврежденных канальцев. х 20

На 15 суток по окончании введения препарата в ткани почек были найдены обширные зоны некроза канальцев в стадии организации, которые распространялись на весь нефрон от кортикальной или юкстамедуллярной зоны до прямых канальцев мозговой зоны (фото 11б). В клубочках, прилежащих к зоне фиброза, было отмечено утолщение капсулы и очаговая атрофия капиллярной сети. На месте поврежденных канальцев формировались кисты, выстланные плоским эпителием (фото 11в).

В миокарде под действием высокой дозы антрафурана возникали очаговые изменения в виде отека и токсической кардиомиопатии. Если на 1 сутки после курса множественные мелкие очаги токсической кардиомиопатии были найдены в миокарде у 2 животных, то на 15 суток по окончании введения крупные очаги отека и кардиомиопатии были обнаружены у всех животных (фото 10в).

В двенадцатиперстной кишке применение препарата в высокой дозе вызывало очаговую атрофию эпителия ворсинок и крипт, усиление слизиобразования, в единичных случаях – некроз. В течение 2 недель структура слизистой оболочки восстанавливалась, очаги некроза подвергались организации.

Применение препарата в высоких дозах вызывало атрофию лимфоидной ткани. В лимфоузлах и селезенке она была выражена слабо. В отдельных долях

тимуса умеренная атрофия лимфоидной ткани регистрировалась и в корковой, и в мозговой зоне. Если структура селезенки лимфоузлов восстанавливалась полностью, то в отдельных дольках тимуса она сохранялась в течение 2 недель и сопровождалась признаками акцидентальной инволюции.

Изменения структуры щитовидной железы свидетельствуют о снижении ее функциональной активности, что может быть связано как с прямым воздействием препарата на фолликулярный эпителий, так и опосредованным через гипоталамо-гипофизарную систему. Последнее предположение основано на данных фармакокинетических исследований, показавших, что антрафуран при пероральном введении преодолевает гематоэнцефалический барьер и накапливается в значительном количестве в ткани мозга.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что 15-кратное ежедневное пероральное введение антрафурана в лекарственной форме в разовых дозах, составляющих 1/15 от МПД (2 мг/кг) и 1/15 от ЛД₅₀ (6 мг/кг), хорошо переносится животными, изменений в их состоянии и поведении не вызывает. Достоверное отставание прироста массы тела подопытных животных по сравнению с кроликами контрольной группы было отмечено на 7 сутки после окончания курса введений препарата в обеих изученных дозах. Гематологические исследования не выявили какого-либо влияния препарата на показатели периферической крови животных.

При биохимическом исследовании сыворотки крови сразу после окончания курса введений препарата в обеих подопытных группах обнаружено увеличение активности АЛТ и АСТ. Другие изученные показатели на всем протяжении эксперимента оставались в пределах физиологической нормы и не отличались от контроля.

Клинический анализ мочи, проведенный на 1 сутки после курса введений препарата, выявил увеличение содержания уробилиногена, кетонов и белка и уменьшение удельного веса мочи в обеих подопытных группах. К концу наблюдения состав мочи подопытных животных возвращался к нормальным

значениям. На 1 сутки после курса выявлено достоверное уменьшение МК тимуса и увеличение МК печени у животных, получавших препарат в высокой дозе. Препарат, применённый в обеих изученных дозах, не оказывал влияния на состояние сердечно-сосудистой системы подопытных животных.

Таким образом, в результате проведенных клинико-лабораторных исследований удалось установить, что препарат антрафуран обладает гепато- и нефротоксическими свойствами. Гепатотоксичность препарата подтверждается повышением уровня активности трансаминаз в сыворотке крови и увеличением массового коэффициента печени подопытных животных. Признаки нефротоксичности проявляются в повышении уровня белка и уробилиногена в моче и снижении ее удельного веса.

Признак гастроинтестинальной токсичности - отставание в приросте массы тела животных подопытных групп на 7 сутки после окончания введений препарата.

Хотя применение антрафурана не оказывало влияния на клеточный состав периферической крови, уменьшение массового коэффициента тимуса у животных, получавших препарат в высокой дозе, может свидетельствовать о возможном проявлении гематотоксических свойств при передозировке.

Данные клинико-лабораторных исследований подтвердились при патоморфологическом изучении органов и тканей кроликов. Гепатотоксичность препарата морфологически выражалась в дистрофических и деструктивных изменениях гепатоцитов, которые при достижении дозы, суммарно эквивалентной ЛД₅₀, могут привести к фиброзу ткани печени.

Нефротоксичность проявлялась дистрофических и деструктивных изменениях эпителия извитых и прямых канальцев. При превышении переносимых доз повреждения регистрировались уже и в клубочковой системе почек, а некротические изменения канальцев завершались фиброзом и формированием кист.

Морфологические признаки гастроинтестинальной (очаговая атрофия эпителия слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки) и гематотоксичности (атрофические изменения лимфоидной ткани селезенки, лимфоузлов и тимуса) были отмечены при передозировке препарата.

Таким образом, изменения функциональной активности и строения внутренних органов кроликов, возникающие под действием антрафурана, примененного перорально в лекарственной форме, зависят от величины примененной дозы. При курсовом введении препарата в дозе, суммарно эквивалентной МПД, они полностью обратимы в течение 15 дней.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

К настоящему времени накоплено достаточно много данных относительно изучения новых антрациклинов и антрацендионов улучшенными терапевтическими свойствами. В предклинических и клинических исследованиях оценивается следующее поколение препаратов этого класса [146-150]. Поскольку в качестве терапевтических мишеней этих антибиотиков признаны топоизомеразы человека I и II, то изучено большое количество ингибиторов различных изоформ данных ферментов. Большинство из них находится в стадии разработки [151, 152].

В доступной литературе отсутствуют данные о получении и изучении субстанций и лекарственных форм мультитаргетных антрацендионов, обладающих высокой противоопухолевой активностью, а также отсутствуют зарегистрированные лекарственные средства для перорального применения, содержащие в качестве действующего вещества производные антрацендиона, за исключением митоксантрона. Одной из задач проведенного исследования была сравнительная оценка противоопухолевой активности и параметров острой токсичности антрафурана при различных путях введения. Было изучено 3 пути введения препарата: внутрибрюшинный, внутривенный и пероральный.

При внутрибрюшинном пути введения препарат, примененный как в субстанции, так и в ЛФ, проявил высокую противоопухолевую активность на прогностически значимых моделях перевиваемых опухолей мышей и ксенографтах опухоли человека.

Во всех случаях препарат при однократном введении оказывал дозозависимое токсическое действие, вызывая с увеличением введенной дозы пропорциональный рост числа павших животных. Сравнение основных токсикологических параметров показывает, что острая токсичность для мышей при внутрибрюшинном введении прототипа лекарственной формы (таб. 21) несколько ниже токсичности субстанции ($LD_{50} = 52,5$ мг/кг и МПД = 39,4 мг/кг, мыши).

Таблица 21. Основные параметры токсичности (ЛД₅₀ и МПД) лекарственной формы антрафурана для мышей и крыс при парентеральном введении.

Способ введения	Внутрибрюшинно		Внутривенно	
	Мыши	Крысы	Мыши	Крысы
ЛД ₅₀ , мг/кг	68,3	64,6	5,9	17,1
МПД (ЛД ₁₀), мг/кг	47,2	47,6	3,6	15,2

Токсичность лекарственной формы антрафурана при внутрибрюшинном введении для мышей и крыс оказалась практически одинаковой, о чем свидетельствуют близкие величины ЛД₅₀ и МПД (таб. 21). Близкими эти показатели для мышей и крыс оказались и при пероральном применении ЛФ препарата (таб. 22), что может свидетельствовать об отсутствии видовой специфичности токсического действия.

Таблица 22. Основные параметры токсичности (ЛД₅₀ и МПД) лекарственной формы антрафурана для мышей и крыс при внутрибрюшинном и пероральном введении.

Путь введения	Параметр	Доза для мышей, мг/кг	Доза для крыс, мг/кг	Сроки гибели (сутки)
Внутрибрюшинно	ЛД ₅₀	68,3(62,1÷75,1)	64,6(56,1÷72,5)	0 – 1
	МПД	47,2(45,3÷49,9)	47,6(45,3÷49,9)	
Перорально	ЛД ₅₀	306,7(209,1÷404,3)	353,6(253,2÷457,7)	3 – 10
	МПД	128,9(115,7÷142,1)	171,7(122,9÷220,5)	

С другой стороны, для обоих видов животных при внутривенном введении токсичность препарата оказалась в несколько раз выше, чем при внутрибрюшинном, причем для крыс различие в острой токсичности при внутрибрюшинном и внутривенном применении значительно меньше, чем для мышей. Так, отношение ЛД₅₀ при внутрибрюшинном введении к ЛД₅₀ при

внутривенном введении для мышей составило 11,6, в то время как для крыс аналогичный параметр равен 3,8. Выявленное различие в токсичности при внутривенном введении антрафурана для мышей и крыс может быть связано с более высокой скоростью поступления препарата в кровь у мышей, имеющих меньший объем циркулирующей крови в сравнении с крысами. Кроме того, меньшая токсичность для крыс может быть связана с различием во взаимодействии препарата с биомембранами или в скорости проникновения его через гистогематические барьеры, и, как следствие, различным распределением препарата в тканях внутренних органов разных видов животных.

Хотя причина смерти животных при внутрибрюшинном и внутривенном пути введения предположительно одинакова (сердечно-сосудистая недостаточность, вызванная нейротоксическим действием), гибель животных при внутривенном применении летальных доз наступает практически «на игле», а диапазон переносимых доз столь мал, что не позволяет достигнуть эффективных величин.

По результатам исследования острой токсичности определены верхние границы диапазонов действующих доз для различных способов применения лекарственной формы антрафурана, которые для противоопухолевых препаратов, как правило, ограничиваются величиной МПД. Кроме того, на основании полученных результатов, в соответствии с классификацией К.К.Сидорова антрафуран ЛХТА-2034 был отнесен к 3 классу токсичности (умеренно токсичные препараты).

Особенности токсикологических параметров антрафурана при внутривенном введении привели к заключению о невозможности использования данного пути введения, наиболее часто применяемого в клинической практике для противоопухолевых средств антрахинонового ряда (доксорубицина, рубомицина, митоксантрона), которые вводятся пациентам преимущественно в виде медленной внутривенной инфузии [115]. Эффективное пероральное применение для этих препаратов нереализуемо в связи с нестабильностью или из-за низкого всасывания из желудочно-кишечного тракта.

Использование внутрибрюшинного способа введения антрафурана вполне возможно, хотя достаточно ограничено локализацией злокачественного процесса. На данный момент имеются доказательства эффективности внутрибрюшинной химиотерапии при первичных опухолях брюшины (мезотелиомы, псевдомиксомы) и ее поражении метастазами при раке, возникающем в различных органах (колоректальном раке, раке желудка, яичников, печени, поджелудочной железы, опухоли аппендикса) [153, 154]. Внедрение новых методов и средств лечения этих состояний весьма актуально, т.к. в зависимости от происхождения опухолевых очагов, средняя продолжительность жизни при канцероматозе брюшины и отсутствии лечения составляет от 6 недель до 6 месяцев.

Когда было обнаружено, что при пероральном способе введения водной композиции антрафуран обладает хорошей биодоступностью и высокой противоопухолевой активностью [129], возникла идея создания пероральной лекарственной формы антрафурана, тем более что в настоящее время около 30% противоопухолевых препаратов применяют перорально, включая многие биотерапевтические средства [155]. Пероральные лекарственные формы были созданы и для ряда цитостатиков. Так, один из первых пероральных цитостатиков - антимаболит кселода, эффективный при лечении рака желудка, колоректального рака и рака молочной железы, позволяет провести полный курс химиотерапии в домашних или амбулаторных условиях [115, 156]. Высокая биодоступность позволяет достигать полной или частичной ремиссии при пероральном применении некоторых алкилирующих агентов, противоопухолевых антибиотиков и препаратов других классов. В связи с этим все больше врачей-онкологов стало отдавать предпочтение пероральным химиопрепаратам, поскольку этот путь введения улучшает качество жизни больных и позволяет сократить время их пребывания в клинике [157].

Однако исследование кинетики растворения субстанции антрафурана в биорелевантных средах (например, в искусственном желудочном соке при 37°C)

показало, что антрафуран относится к препаратам с низкой биофармацевтической растворимостью, что лимитирует попадание соединения в системный кровоток при пероральном применении.

В результате проведения интенсивных исследований был разработан ряд жидких и твердых фармацевтических композиций, обеспечивающих высокую растворимость и биодоступность антрафурана при пероральном применении, а также стабильность лекарственного средства при хранении [129]. Разработанные композиции обладают высокой противоопухолевой активностью и могут быть использованы для получения пероральных дозированных лекарственных форм антрафурана.

Такая фармацевтическая композиция для твердых желатиновых капсул, соответствующая основным фармакопейным стандартам, была использована в данном исследовании для изучения основных терапевтических характеристик эффективности и переносимости антрафурана, а также для определения его токсикологических характеристик в оптимальной лекарственной форме при пероральном применении.

Экспериментальная оценка терапевтических характеристик антрафурана на подкожно привитых солидных опухолях или лейкемии мышей, а также на ксенотрансплантатах рака молочной железы человека выявила высокую противоопухолевую эффективность препарата при пероральном введении. Противоопухолевый эффект и увеличение продолжительности жизни мышей с лейкемией P388 в эквивалентных терапевтических дозах и режимах антрафурана (5-дневный график) были аналогичны для внутривенного и перорального введения: $T/C_{max}=214\%$ (5×30 мг/кг) против $T/C_{max}=223\%$ (5×80 мг/кг) соответственно. Признаки токсичности наблюдались только при суммарной дозе 620 мг/кг. Кроме того, пероральное введение антрафурана на моделях солидных опухолей мышей Ca755 и LLC показало значительный высокий долгосрочный противоопухолевый эффект (TPO=91 % и 84% соответственно) [129]. В частности, в течение двух недель после трансплантации опухоли LLC в группе

лечения было отмечено несколько случаев полной ремиссии (CRMAX=54%). Противоопухолевая активность антрафурана была также подтверждена на ксенотрансплантатах рака молочной железы человека мышам Balb/c nude. Таким образом, оптимальный режим перорального введения антрафурана – пятикратно ежедневно в разовых дозах 70-100 мг/кг. Такой режим позволяет достичь значительного ингибирования роста опухоли или увеличения продолжительности жизни мышей на различных прогностически значимых для клиники моделях опухолей. Увеличение разовой эффективной дозы для пероральной терапии хорошо коррелирует с результатами исследования фармакокинетики антрафурана, которое показало, что биодоступность перорально вводимого антрафурана у крыс достигает 31% [158].

Определение токсикологических характеристик антрафурана в оптимальной лекарственной форме при пероральном применении было проведено на кроликах «Советская шиншилла», самцах, которые получали фармацевтическую композицию препарата в желатиновых капсулах, содержание активного вещества в которых было рассчитано индивидуально для каждого животного.

Ежедневное введение антрафурана в дозах, суммарно составляющих МПД и ЛД₅₀, хорошо переносилось животными; смертности не наблюдалось. Существенных изменений в потреблении пищи и воды не происходило. Лечение вызвало кратковременное снижение массы тела, что может быть истолковано как косвенное свидетельство желудочно-кишечной токсичности. Никаких других признаков желудочно-кишечной токсичности ни клиническими, ни морфологическими методами обнаружено не было. Слабо выраженную гастроинтестинальную токсичность можно рассматривать как преимущество исследуемого препарата перед противоопухолевыми агентами этого ряда - антрациклинами и структурно сходными с ними антрацендионами. Для этих высокоэффективных антибластомных соединений, широко используемых для лечения злокачественных опухолей, характерны такие признаки токсичности, как снижение массы тела, повреждение желудочно-кишечного тракта, угнетение

крововетворения и сперматогенеза, повреждение почек, кардиотоксичность. Они хорошо известны и описаны многими авторами [145, 159, 160].

Основными ограничивающими дозу токсическими свойствами доксорубицина, а также даунорубицина, эпирубицина и идарубицина являются нейтропения и кардиомиопатия [160]. Большинство исследователей отмечают, что гематологическая токсичность антрациклинов эквивалентна их кардиотоксичности [119]. При использовании антрафурана гематологические показатели оставались в пределах физиологической нормы на протяжении всего исследования. Снижение МК тимуса у животных, получавших высокую дозу антрафурана, может указывать на возможное проявление гематотоксических свойств при передозировке. Патоморфологическое исследование подтвердило, что введение антрафурана в дозе 6 мг/кг/сут. вызывает умеренную атрофию лимфоидной ткани тимуса, селезенки и лимфатических узлов. Структура селезенки и лимфатических узлов полностью восстанавливалась. В отдельных дольках тимуса она сохранялась в течение 2 недель.

Признаки кардиотоксичности были выявлены только при патоморфологическом исследовании. После введения антрафурана в дозе, суммарно составляющей МПД, морфологические признаки токсической кардиомиопатии были выражены умеренно, а к концу наблюдения структура миокарда полностью восстанавливалась. Высокая доза антрафурана вызывала те же изменения, что и низкая на 1-й день после курса, но на 15-й день после курсов введений антрафурана они усиливались. Можно предположить, что препарат при превышении переносимых доз способен проявлять кардиотоксические свойства.

Клинические, лабораторные и морфологические исследования показали, что антрафуран, применяемый в обеих изученных дозах, проявляет гепато- и нефротоксические свойства. Гепатотоксичность проявлялась в повышении уровня трансаминаз в сыворотке крови кроликов и в увеличении МК печени. После введения низких доз препарата на 1 день после курса введений повреждения структуры печени были выражены умеренно, а через 2 недели морфология печени

не отличалась от контроля. При применении антрафурана в дозе, составляющей ЛД₅₀, структура печени к концу эксперимента восстанавливалась лишь частично.

Признаки нефротоксичности проявлялись в повышении уровня белка и уробилиногена в моче и снижении ее удельного веса. Степень нарушения морфологии почек и скорость восстановления зависели от величины примененной дозы.

Хорошо известно, что доксорубин оказывает значительное токсическое действие на семенники у мужчин и животных [161, 162]. Важно отметить, что в нашем исследовании в семенниках никаких патологических изменений не наблюдалось.

Результаты исследования токсических свойств пероральной лекарственной формы антрафурана, полученные в этом исследовании, согласуются с ранее полученными данными при изучении токсикологических особенностей субстанции препарата на крысах.

Сопоставляя клинико-лабораторные и патоморфологические данные, полученные в ходе исследования, можно утверждать, что гастроинтестинальная токсичность субстанции антрафурана по критерию прироста массы тела выявляется только при введении препарата в высокой дозе (5ТД). При патоморфологическом исследовании были найдены изменения в желудке и отделах кишечника, интенсивность которых зависела от дозы препарата. Проявления гастроинтестинальной токсичности при введении субстанции были выражены сильнее, чем при применении его в ЛФ. Это можно объяснить тем, что после перорального введения субстанция антрафурана всасывается из ЖКТ в кровь в 2 раза медленнее, поэтому его повреждающее действие на слизистую оболочку желудка и кишечника крыс проявилось в большей степени, чем у кроликов [158].

Гематотоксические свойства антрафурана при курсовом введении субстанции крысам в 1ТД были выражены умеренно и регистрировались только при изучении структуры лимфоидных органов. При применении в высокой дозе

препарат вызывал транзиторное уменьшение числа эритроцитов, содержания гемоглобина, величины гематокрита, а также снижение общего количества лейкоцитов в периферической крови, которое происходило за счёт относительной лимфоцитопении. Лимфотоксическое действие препарата подтверждалось атрофическими изменениями лимфоидной ткани селезенки, лимфоузлов и тимуса, а также уменьшением массового коэффициента тимуса. Выраженная гематотоксичность, обнаруженная в эксперименте на крысах, связана, по-видимому, с тем, что при применении препарата в виде субстанции он в 5 раз медленнее выводится из организма [158]. У крыс, в отличие от кроликов, лимфоидный тип кроветворения. Этим можно объяснить снижение количества лейкоцитов в периферической крови крыс, которое происходило, главным образом, за счет уменьшения числа лимфоцитов. Правильность этого предположения подтверждается снижением массы тимуса как у крыс, так и у кроликов.

Нефротоксическое действие субстанции антрафурана определяется как клинически, так и морфологически. При 5-кратном превышении терапевтической дозы оно выражается в повреждении канальцевой и клубочковой системы почек и проявляется в виде длительно сохраняющейся гематурии и нитратурии.

Важно, что кардиотоксические свойства субстанции препарата были зарегистрированы только морфологически и проявлялись на 30 сутки по окончании курса введений у крыс, получавших препарат в высокой дозе.

Изучение структуры мозга позволяет утверждать, что при использовании в высокой дозе препарат преодолевает гематоэнцефалический барьер и вызывает токсическую энцефалопатию.

Хотя при изучении хронической токсичности на крысах была использована субстанция антрафурана, а на кроликах – лекарственная форма, в обоих случаях токсические свойства антрафурана зависели от дозы, а многократное введение терапевтических доз препарата вызывало преходящие, полностью обратимые токсические эффекты [163].

Таким образом, оценка субхронической токсичности антрафурана показала, что этот препарат менее токсичен при пероральном применении по сравнению с антрациклинами и антрацендионами. Большинство его побочных эффектов обратимо. В целом, результаты исследований указывают на высокий потенциал для дальнейшего развития этого нового противоопухолевого средства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени накоплено достаточно много информации относительно изучения новых антрациклинов и антрацендионов с улучшенными терапевтическими свойствами. Однако, данные о мультитаргетных антрацендионах, обладающих высокой противоопухолевой активностью, в доступной литературе отсутствуют. Единственным лекарственным средством, относящимся к классу антрацендионов, многие годы остается митоксантрон.

Антрафуран, разработанный в ФГБНУ «НИИНА», - производное антра[2,3-*b*]фуран-3-карбоксамиды – мультитаргетный препарат, одновременно ингибирующий несколько мишеней, важных для опухолевого роста, способен подавлять пролиферацию опухолевых клеток различного гистогенеза, в том числе, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. В ходе проведенного исследования была продемонстрирована значимая терапевтическая эффективность антрафурана как при парентеральном, так и при пероральном пути введения. Был определен диапазон переносимых и токсических доз антрафурана, установлены причины гибели животных при передозировках при различных путях введения. На различных клинически значимых моделях перевиваемых опухолей мышей и человека отработан диапазон терапевтических доз и режим введения лекарственной формы антрафурана для перорального применения. В результате были получены данные об эффективности и безопасности потенциального лекарственного средства, оценены токсические свойства субстанции и фармацевтической композиции препарата для перорального введения. При изучении субхронической токсичности субстанции и лекарственной формы антрафурана был определен спектр функциональных и морфологических изменений органов и тканей, установлена их зависимость от дозы и обратимость токсического действия.

Было доказано экспериментально, что антрафуран – синтетический аналог классического цитотоксических антрациклиновых антибиотиков – при наличии полифармакологического (мультитаргетного) механизма действия при введении

внутри не имеет дозолимитирующих видов токсичности, т.е. диапазон эффективных доз достаточно широк, чтобы избежать ограничений по дозе и длительности применения.

Таким образом, завершено предклиническое изучение препарата антрафуран в качестве противоопухолевого средства для перорального применения. Установлены особенности его побочного действия. Определены вероятные токсические реакции при передозировках. Полученные терапевтические и токсикологические характеристики антрафурана будут востребованы при формировании программы клинических испытаний.

Высокая противоопухолевая активность антрафурана при внутрибрюшинном пути введения указывает на возможность его применения для региональной химиотерапии при перитонеальном карциноматозе, обусловленном метастазированием колоректального рака, рака яичников, аппендикса, карциномы поджелудочной железы, желудка. Проникновение препарата через гематоэнцефалический барьер при пероральном введении открывает перспективу его использования для лечения опухолей мозга.

Параметры фармакодинамических эффектов антрафурана, полученные на адекватных опухолевых моделях, могут составить основу для разработки и оптимизации лекарственных средств - производных антрахинонов, а результаты проведенного исследования позволят уточнить стратегию последующего доклинического и клинического исследования препаратов близкой структуры и механизма действия.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что антрафуран высокоэффективен на клинически значимых моделях перевиваемых опухолей мышей и ксенографтах опухоли человека при внутрибрюшинном и пероральном способах применения. Оптимальным является режим ежедневного пятикратного введения в разовых дозах 30 мг/кг (~МПД внутрибрюшинно) и 80 мг/кг (60% от МПД перорально).

2. Установлено, что при внутривенном введении диапазон переносимых и токсических доз антрафурана крайне узок, а при введении переносимых доз препарат противоопухолевого действия не оказывает.

3. Показано, что токсичность при пероральном пути введения уменьшается примерно 10 раз по сравнению с внутрибрюшинным и в 100 раз по сравнению с внутривенным. На основании полученных данных о переносимых и токсических дозах антрафуран отнесен к 3 классу токсичности (умеренно токсичные препараты).

4. Установлено, что причиной смерти при парентеральных путях введения антрафурана является сердечно-сосудистая недостаточность, вызванная нейротоксическим действием препарата. При пероральном применении гибель животных наступает на фоне кишечной и гематологической токсичности.

5. Установлено, что субстанция антрафурана при субхроническом пероральном применении обладает гемато-, нефро-, кардио-, гепато- и гастроинтестинальной токсичностью. В разовой дозе, 5-кратно превышающей терапевтическую, антрафуран вызывает изменения структуры мозга. В разовой дозе, эквивалентной 1 терапевтической, проявления указанных выше видов токсичности менее выражены и полностью обратимы в течение 30 дней.

6. Показаны преимущества антрафурана перед антрациклинами, применяемыми в клинике, по кардиотоксичности, которая проявляется только патоморфологически в виде транзиторной умеренной кардиомиопатии при превышении переносимых доз.

СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

- Антрафуран – рабочий шифр ЛХТА-2034, метилсульфонат (S)-3-[(3-амино-1-пирроли-динил)карбонил]-4,11-дигидрокси-2-метилантра-[2,3-b]фуран-5,10-диона
- ЛФ – лекарственная форма
- АТФ – аденозинтрифосфат
- РТК – рецепторные тирозинкиназы
- ИТК – ингибиторы тирозинкиназ
- ОМЛ – острый миелобластный лейкоз
- ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
- LLC – мышинная метастазирующая эпидермоидная карцинома легкого Льюис
- B16 – мышинная метастазирующая пигментная меланома
- T47D – аденокарцинома молочной железы человека (подкожный ксенографт)
- Balb/c nude – линия гетерозиготных иммунодефицитных мышей
- УПЖ – увеличение продолжительности жизни
- ТД – терапевтическая доза
- ТРО – торможение роста опухоли
- Т/С – treatment/control (критерий противоопухолевого эффекта *in vivo*)
- ФК – фармакокинетика
- ЛД – летальная доза
- МПД – максимально переносимая доза
- FDA – Food and Drug Administration, управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
- п/к – подкожно
- в/б – внутривенно
- в/в – внутривенно
- п/о – перорально, в желудок
- ОКЛ – общее количество лейкоцитов периферической крови
- ЭКГ – электрокардиограмма
- МК – массовый коэффициент
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- «÷» – диапазон варьирования доз

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. — М., МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. – 2018. — 250 с.
2. Мерабишвили В.М. Среднесрочный вариантный прогноз смертности населения России от злокачественных новообразований // Сибирский онкологический журнал. – 2019. – Т. 18. №4. – С. 5–12.
3. Рациональная фармакотерапия в онкологии: руководство для практикующих врачей. / Под ред. Давыдова М.И., Горбуновой В.А. – М., Литтерра. – 2017. – 880 с.
4. Горбунова В.А., Орел Н.Ф., Бесова Н.С. Современные достижения в клинической химиотерапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2. – №3. – С. 15-26.
5. Горбунова В.А., Маренич А.Ф., Реутова Е.В., Коломейцева А.А., Моисеев А.А., Мазуренко Н.Н., Гагарин И.М., Беляков И.С. Индивидуализация лекарственного лечения немелкоклеточного рака легкого // Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология. – 2011. – №1. – С.37-41.
6. Имянитов Е.Н. Общие представления о таргетной терапии // Практическая онкология. – 2010. – Т. 11. – №3. – С. 123-129.
7. Хвастунов Р.А., Скрыпникова Г.В., Усачев А.А. Таргетная терапия в онкологии // Лекарственный вестник. – 2014. – Т. 8. – №4(56). –С. 3-10.
8. Переводчикова Н.И., Горбунова В.А. Таргетные препараты и их клиническое использование: введение в проблему // Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология. – 2013. – Т. 24. –№ 3. – С. 6-13.
9. Oflazoglu E., Audoly L.P. Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology // MAbs. – 2010. № 1. – P. 14–19.

10. DeVita V.T. Jr, Lawrence T.S., Rosenberg S.A. Cancer: principles & practice of oncology. 10th edition. Philadelphia, 2015.
11. Larkin J.M.G., Lewis K.D., Ribas A., Flaherty K., Ascierto P.A., Dréno B. Impact of gene expression profiles on clinical predictors of survival in patients with BRAFV600-mutated metastatic melanoma // J. Clin. Oncol. – 2017. – 5(suppl). – 9556.
12. Xin H., Zhang C., Herrmann A., Du Y., Figlin R., Yu Hua. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells // Cancer Res. –2009. – № 6. – 2506–2513.
13. Новик А.В. Принципы современной иммунотерапии // Фарматека. – 2018. – № 7. – С. 10-18.
14. В.А. Горбунова. О прошлом, настоящем и будущем таргетной терапии // Эффективная фармакотерапия. Онкология, гематология и радиология. – 2013. – Т. 24. –№ 3. – С. 4-5.
15. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. / – М., Практическая медицина. – 2006. – 512 с.
16. Teicher B. Preclinical evidence supporting combinations of targeted agents // Ann. Of Oncol. – 2008. – V 19. – suppl 3. – iii16.
17. Sosman J., Puzanov I., Atkins M., Flaherty R. Combination targeted therapy in advanced renal cell carcinoma // Ann. of Oncol. – 2008. – V 19. – suppl 3. – iii16.
18. Herbst R., Johnson D., Mininberg E., Carbone D., Henderson T., Kim E. S., Blumenschein G., Lee J.-K. J., Liu D.D., Truong M., W., Tran H., Tsao A., Xie D., Ramies D., Mass R., Seshagiri S., Eberhard D., Kelley S., Sandler A. Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with HER1/Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer // J. Clin. Oncol. – 2005. – V 23. – № 11. – P. 2544-2555.

19. Феденко А.А., Горбунова В.А. Антиангиогенная терапия в лечении сарком мягких тканей // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2012. – № 3. – С. 33-38.
20. Simon R. Re-Examination of the design of early clinical development trials for Molecularly targeted drugs // ASCO. – 2006. – Educational Book. – P. 126-129.
21. Насхлеташвили Д.Р., Горбунова В.А., Москвина Е.А. Современные возможности таргетной терапии в лечении больных раком молочной железы с гиперэкспрессией HER-2/neu и с метастатическим поражением головного мозга // Вопросы онкологии. – 2013. – Т. 59. – № 3. – С. 347-351.
22. Горбунова В.А. Эверолимус (афинитор): новые возможности терапии злокачественных опухолей // Фарматека. – 2014. – № 8. – С. 46-52.
23. Лубенникова Е.В., Жукова Л.Г., Арутюнян Э.А. Икземпра – новые возможности цитостатической терапии рака молочной железы // Фарматека. – 2017. – №8. – С. 81-86.
24. Larkin J.M.G., Kaye S.B. Etoposides in the treatment of cancer // Expert Opin. Investigational Drugs. – 2006. – V. 15. – № 6. – P. 691–702.
25. Lee F.Y.F., Covello K.L., Castaneda S., Hawken D.R., Kan D., Lewin A., Wen M.L., Ryseck R.P., Fairchild C.R., Fagnoli J., Kramer R. Synergistic antitumor activity of ixabepilone (BMS-247550) plus bevacizumab in multiple in vivo tumor models // Clin. Cancer Res. – 2008. – 14. № 24. – 8123–8131.
26. Lee F.Y.F., Borzilleri R., Fairchild C.R., Kim S.H., Long B.H., Reventos-Suarez C., Vite G.D., Rose W.C., Kramer R.A. Experimental Therapeutics, Preclinical Pharmacology-BMS-247550: A Novel Etoposide Analog with a Mode of Action Similar to Paclitaxel but Possessing Superior Antitumor Efficacy // Clin. Cancer Res. – 2001. – V. 7. – № 5. – 1429–1437.
27. Towle M.J., Salvato K.A., Budrow J., Wels B.F., Kuznetsov G., Aalfs K.K., Welsh S., Zheng W., Seletsky B.M., Palme M.H., Habgood G.J., Singer L.A., Di Pietro L.V., Wang Y., Chen J.J., Quincy D.A., Davis A., Yoshimatsu K., Kishi Y., Yu M.J., Littlefield B.A. In vitro and in vivo anticancer activities of synthetic

macrocyclic ketone analogues of halichondrin B // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – № 3. – 1013–1021.

28. Champoux, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. // *Annu. Rev. Biochem.* – 2001. – V. 70. – P. 369–413.

29. Corbett, K.D. and Berger, J.M. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2004. – V. 33. – P. 95–118.

30. Nitiss, J.L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions // *Nat. Rev. Cancer.* – 2009. – V. 9. – P. 327–337.

31. Chen, S.H., Chan, N.-L., Hsieh, T.-s. New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases // *Annu. Rev. Biochem.* – 2013. – V. 82. – P. 139–170.

32. Pommier Y., Sun Y., Huang S.-y.N., Nitiss, J.L. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2016. – V. 17. – P. – 703–721.

33. Delgado J. L., Hsieh C.-M., Chan N.-L., Hiasa H. Topoisomerases as anticancer targets // *Biochemical. Journal.*-Jan. – 2018. – V. 23. – № 475(2). – P. 373–398.

34. Lima C.D., Wang J.C., Mondragón A. Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I // *Nature.* – 1994. – V. 367. – P. 138–146.

35. Koster D.A., Croquette V., Dekker C., Shuman S., Dekker N.H. Friction and torque govern the relaxation of DNA supercoils by eukaryotic topoisomerase IB. // *Nature.* – 2005. – V. 434. – P. 671–674.

36. Berger J.M., Gamblin S.J., Harrison S.C., Wang J.C. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II // *Nature.* – 1996. – V. 379. – P. 225–232.

37. Dewese J.E., Osheroff N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37. – P. 738–748.

38. Hiasa H. DNA topoisomerases as targets for antibacterial agents // *Methods Mol. Biol.* – 2018. – V. 1703. – P. 47–62.
39. Ehmann D.E., Lahiri S.D. Novel compounds targeting bacterial DNA topoisomerase/DNA gyrase // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2014. – V. 18. – P. 76–83.
40. Kretzschmar M., Meisterernst M., Roeder R.G. Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II // *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* – 1993. – V. 90. – P. 11508–11512.
41. Baranello L., Wojtowicz D., Cui K., Devaiah B.N., Chung H.-J., Chansalis K.Y. RNA polymerase II regulates topoisomerase 1 activity to favor efficient transcription // *Cell.* – 2016. – V. 65. – P. 357–371.
42. Douarre C., Sourbier C., Dalla Rosa I., Brata Das B., Redon C.E., Zhang H., Neckers L., Pommier Y. Mitochondrial topoisomerase I is critical for mitochondrial integrity and cellular energy metabolism // *PLoS ONE.* – 2012. – V. 7. – № 7. – e41094.
43. Khiati S., Baechler S.A., Factor V.M., Zhang H., Huang S.-y.N., Dalla Rosa I., Sourbier C., Neckers L., Thorgeirsson S. S., Pommier Y. Lack of mitochondrial topoisomerase I (TOP1mt) impairs liver regeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2015. – V. 112. – P. 11282–11287.
44. Ju B.-G., Rosenfeld M.G. A breaking strategy for topoisomerase II β /PARP-1-dependent regulated transcription // *Cell Cycle.* – 2006. – V. 5. – P. 2557–2560.
45. Ju B.-G., Lunyak V.V., Perissi V., Garcia-Bassets I., Rose D.W., Glass C.K., M.G. Rosenfeld. A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription // *Science.* – 2006. – V. 312. – P.1798–1802.
46. Austin C.A., Sng J.-H., Patel S., Fisher L.M. Novel HeLa topoisomerase II is the II β isoform: complete coding sequence and homology with other type II topoisomerases // *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expr.* – 1993. – V. 1172. – P. 283–291.

47. Marinello J., Delcuratolo M., Capranico G. Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19. – № 11. – P. 3480.

48. Sheng C., Miao Z., Zhang W. New strategies in the discovery of novel non-camptothecin topoisomerase I inhibitors // *Curr Med Chem.* – 2011. – V. 18. – P. 4389–4409.

49. Производные пиридинона и пиридазинона в качестве ингибиторов поли(адп-рибоза) полимеразы (parp) // Патент Российской Федерации № 2472782 / Джоунс Ф., Кинцель О., Пескаторе Д., Шульц-Фадемрехт К., Ллаугер Б.Л., Ферриньо Ф., –заявл. 25.05.2007; опубл. 20.01.2013.

50. Мультицелевые ингибиторы опухолевого роста на основе линейных гетероаренантраценоидов // Патент Российской Федерации № 2527273 / Щекотихин А.Е., Тихомиров А.С., Синкевич Ю.В., Дянков Д.Г., Резников М.И., Трещалина Е.М., Ксодо Л., Штиль А.А., Преображенская М.Н. – №2013108388/04, заявл. 27.02.2013; опубл. 27.08.2014, Бюл. № 24.

51. D'yakonov V.A., Dzhemileva L.U., Dzhemilev U.M. Advances in the Chemistry of Natural and Semisynthetic Topoisomerase I/II Inhibitors. *Studies in Natural Products Chemistry* // – 2017. – V. 54. – P. 21–86.

52. Kloskowski T., Gurtowska N., Olkowska J., Nowak, J.M., Adamowicz J., Tworkiewicz J., Dębski R., Grzanka A., Drewa T. Ciprofloxacin is a potential Topoisomerase II inhibitor for the treatment of NSCLC // *Int J Oncol.* – 2012. – V. 41. – № 6. – P. 1943–9.

53. Ma Y.C., Wang Z.X., Jin S.J., Zhang Y.X., Hu G.Q., Cui D.T., Wang J.S., Wang M., Wang F.Q., Zhao Z.J. Dual Inhibition of Topoisomerase II and Tyrosine Kinases by the Novel Bis-Fluoroquinolone Chalcone-Like Derivative HMNE3 in Human Pancreatic Cancer Cells // *PLoS One.* – 2016. – V. 19. – № 11(10). – e0162821.

54. Abbas J. A, Stuart R. K. Vosaroxin : a novel antineoplastic quinolone // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2012. – № 21. – P. 1223–1233.

55. Pal H.C., Katiyar S.K. Cryptolepine, a Plant Alkaloid, Inhibits the Growth of Non-Melanoma Skin Cancer Cells through Inhibition of Topoisomerase and Induction of DNA Damage // *Molecules*. – 2016. – 21. – № 12. – P. 1758–1764.
56. Xu H., Chen Q., Wang H., Xu P., Yuan R., Li X., Xue M. Inhibitory effects of lapachol on rat C6 glioma in vitro and in vivo by targeting DNA Topoisomerase I and Topoisomerase II // *J Exp Clin Cancer Res*. – 2016. – V. 16. – № 35(1). – P. 178.
57. Zhang C., Qu, Y., Niu B. Design, synthesis and biological evaluation of lapachol derivatives possessing indole scaffolds as Topoisomerase I inhibitors // *Bioorg Med Chem*. – 2016. V. 15. № 24(22). – P. 5781–5786.
58. Jeon K.H., Yu H.B., Kwak S.Y., Kwon Y., Na Y. Synthesis and Topoisomerases inhibitory activity of heteroaromatic chalcones // *Bioorg. Med. Chem*. – 2016. – V. 15. – № 24(22). – P. 5921–5928.
59. Chen T.W., Tsai K.D., Yang S.M., Wong H.Y., Liu Y.H., Cherng J., Chou K.S., Wang Y.T., Cuizon J., Cherng J.M. Discovery of a Novel AntiCancer Agent Targeting Both Topoisomerase I & II as Well as Telomerase Activities in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells In Vitro and In Vivo: Cinnamomum verum Component Cuminaldehyde // *Curr. Cancer Drug Targets*. – 2016. – V. 16. – № 9, – P. 796–806.
60. Rao S.A.V., Vishnu M.V.P.S.V., Reddy N.V.S., Reddy T.S., Shaik S.P., Bagul Ch., Kamal A. Synthesis and biological evaluation of imidazopyridinyl-1,3,4-oxadiazole conjugates as apoptosis inducers and Topoisomerase II α inhibitors // *Bioorg Chem*. – 2016. – № 69. – P. 7–19.
61. Riddell I.A., Park G.Y., Agama K., Pommier Y., Lippard S.J. Phenanthriplatin Acts as a Covalent Topoisomerase II Poison // *ACS Chem Biol*. – 2016. – V. 18. – № 11(11). – P. 2996–3001.
62. Zhang B., Li X., Li B., Gao C., Jiang Y. Acridine and its derivatives: a patent review (20092013) // *Expert Opin Ther Pat*. – 2014. – V. 24. – № 6. – P. 647–664.

63. Ketron AC, Denny WA, Graves DE, Osheroff N. Amsacrine as a topoisomerase II poison: importance of drug-DNA interactions // *Biochemistry*. – 2012. – V. 51. – P. 1730–1739.
64. Matsumoto H., Yamashita T. Tahara S. Hayakawa Sh. Wada K. Tomiok A. Design, synthesis, and evaluation of DNA Topoisomerase II targeted nucleosides // *Bioorg. Med. Chem.* – 2017. – V. 25. № 15. – P. 4133–4144.
65. Sović I., Jambon S., Pavelić S.K., Markova-Car E., Ilić N., Depauw S., Cordonnier D. M-H., Karminski-Zamola G. Synthesis, antitumor activity and DNA binding features of benzothiazolyl and benzimidazolyl substituted isoindolines // *Bioorg. Med. Chem.* – 2018. – V. 26. – № 8. – P. 1950–1960.
66. Meier C., Steinhauer T.N., Koczian F., Plitzko B., Jarolim K., Girreser U., Braig S., Marko D., Vollmar A.M., Clement B. A Dual Topoisomerase Inhibitor of Intense Pro-Apoptotic and Antileukemic Nature for Cancer Treatment // *Chem. Med. Chem.* – 2017. – V. 12. – № 5. – P. 347–352.
67. Sánchez C., Méndez C., Salas J.A. Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity // *Nat. Prod. Rep.* – 2006. – № 23. – P. 1007–1045.
68. Saif M.W., Diasio R.B. Edotecarin: a novel topoisomerase I inhibitor // *Clin. Colorectal Cancer*. – 2005. – № 5. – P. 27–36.
69. Kummar S., Chen A., Gutierrez M, Pfister Thomas D, Wang L., Redon C., Bonner W.M., Yutzy W., Yiping Z., Kinders R.J., Ji J. Clinical and pharmacologic evaluation of two dosing schedules of indotecan (LMP400), a novel indenoisoquinoline, in patients with advanced solid tumors doi: 10.1039/b601930 // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2016. – № 78. – P. 73–81.
70. Pommier Y., Cushman M. The indenoisoquinoline noncamptothecin topoisomerase I inhibitors: update and perspectives // *Mol. Cancer Ther.* – 2009. – № 8. – P. 1008–1014.
71. Ruchelman A.L., Singh S.K., Ray A., Wu X. H., Yang J.-M., Li T.-K., Liu A., Liu L.F., LaVoie E.J. 5H-dibenzo[c,h]1,6- naphthyridin-6-ones: novel

topoisomerase I-targeting anticancer agents with potent cytotoxic activity // *Bioorg. Med. Chem.* – 2003. – № 11. – P. 2061–2073.

72. Baldwin E.L., Osheroff N. Etoposide, topoisomerase II and cancer *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* – 2005. – № 5. – P. 363–372.

73. Najar I.A., Johri R.K. Pharmaceutical and pharmacological approaches for bioavailability enhancement of etoposide // *J. Biosci.* – 2014. – № 39. – P. 139–144.

74. Li J., Chen W., Zhang P., Li N. Topoisomerase II trapping agent teniposide induces apoptosis and G2/M or S phase arrest of oral squamous cell carcinoma // *World J. Surg. Oncol.* – 2006. – № 4. – P. 41

75. Buzuna K., Bielawskaa A., Bielawskib K., Gornowicza A. DNA topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2020. – V. 35. – № 1. – P. 1781–1799

76. Langer S.W. Dexrazoxane for the treatment of chemotherapy-related side effects // *Cancer Manag. Res.* – 2014. – № 6. – P. 357–363.

77. Cvetkovic R.S., Scott L.J. Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy // *Drugs.* – 2005. – № 65. – P. 1005–1024.

78. Murphy M.B., Mercer S.L., Deweese J.E. Inhibitors and poisons of mammalian type II topoisomerase // *Advances in molecular toxicology.* – 2017. – V. 11. – P. 203–240.

79. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy // *J. Cancer Res. Ther.* – 2014. – № 10. – P. 853–858.

80. Airoidi M., Amadori D., Barni S., Cinieri S., De Placido S., Di Leo A., Gennari A., Stefano Iacobelli, Ionta M. T., Lorusso V., Lotrionte M., Marchetti P., Mattioli R., Minotti G., Pronzato P., Rosti G., Tondini C. A., Veronesi A. Clinical activity and cardiac tolerability of non-pegylated liposomal doxorubicin in breast cancer: a synthetic review // *Tumori.* – 2011. – № 97. – P. 690–692.

81. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity // *Pharmacol. Rev.* – 2004. – № 56. – P. 185–229.
82. Ferreira A.L.A., Matsubara L.S., Matsubara B.B. Anthracycline-induced cardiotoxicity // *Cardiovasc. Hematol. Agents Medic. Chem.* – 2008. – № 6. P. 278–281.
83. Di Marco A.; Cassinelli G.; Arcamone F. The discovery of daunorubicin // *Cancer Treat. Rep.* – 1981. – № 65. – Suppl. 4. – P. 3–8.
84. Cersosimo R.J., Hong W.K. Epirubicin: a review of the pharmacology, clinical activity and adverse effects of an Adriamycin analogue // *J. Clin. Oncol.* – 1986. – № 4. – P. 425–439
85. Todorov D.K., Ninjo S.S., Zeller W.J. Antiproliferative activity of liposomal epirubicin on experimental human gliomas in vitro and in vivo after intratumoral/interstitial application // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* – 1995. – № 121. – P. 164–168.
86. Drug Approval Package: Valstar (Valrubicin). – NDA# 20-892 [accessed 2020 Jun 9]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20892.cfm
87. Гаузе Г.Ф., Дудник Ю.В. Противоопухолевые антибиотики. / – М., Медицина. – 1987. – 173 С.
88. Bailly C. Contemporary Challenges in the Design of Topoisomerase II Inhibitors for Cancer Chemotherapy // *Chem. Rev.* – 2012. – № 112, – P. 3611–3640.
89. Nitiss J.L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy // *Nat. Rev. Cancer.* – 2009. – № 9. – P. 338–350.
90. Giuliani F., Casazza A.M., Di Marco A. Virologic and immunologic properties and response to daunomycin and adriamycin of a non-regressing mouse tumor derived from MSV-induced sarcoma // *Biomedicine.* – 1974. – № 21. – P. 435–439.

91. Krysko D.V., Garg A.D., Kaczmarek A., Krysko O., Agostinis P., Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer.* – 2012. – V. 12. – № 12. – P. 860-875.
92. Pommier Y., Sun Y., Huang S.-Y.N., Nitiss J.L. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2016. – № 17. – P. 703–721.
93. Wasowska M., Oszczapowicz., Wietrzyk J., Opolski A., Madej J., Dzimira S., Oszczapowicz J. Influence of the structure of new anthracycline antibiotics on their biological properties // *Anticancer Res.* – 2005. – V. 5(3B). – P. 2043-2048.
94. Anderson M.G, Khoo C.L.Y, Ricards R.G. Oxidation processes in the biosynthesis of the tetracenomycin and ellomycin antibiotics // *J. Antibiot. (Tokyo).* – 1989. – V. 42. – № 3. – P. 468.
95. Paney R., Toussaint M., Mc Guire J., Thome M.C. Maggimycin and anhydromaggimycin — two novel anthracycline antitumor antibiotics // *J. Antibiot. (Tokyo).* – 1989. – Vol. 42, – № 11. – P. 1567.
96. Yamashita Y, Kawada S, Fujii N, Nakano H. Induction of mammalian DNA topoisomerase I and II mediated DNA cleavage by saintopin, a new antitumor agent from fungus // *Biochem.* – 1991. – V. 30. – P. 5838-5845.
97. Fujii N., Yamashita Y., Chiba S., Uosaki Y., Saitoh Y., Tuji Y., Nakano H. UCE6, a new antitumor antibiotic with topoisomerase I mediated DNA cleavage activity, from actinomycetes // *J. Antibiot. (Tokyo).* – 1993. – V. 46. – P. 1173-1174.
98. Khan Q.A., Elban M.A., Hecht S.M. The topopyrones poison human DNA topoisomerases I and II // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2008. – V. 130. – № 39. – P. 12888.
99. Huseman E.D., Byl J.A.W., Chapp S.M., Schley N.D., Osheroff N., Townsend S. D. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Arimetamycin A and Its Daunorubicin and Doxorubicin Hybrids // *ACS Cent. Sci.* – 2021. – № 7. – P. 1327–1337.
100. Yamaoka T., Hanada M., Ichii S., Morisada S., Noguchi T., Yanagi Y. Cytotoxicity of amrubicin, a novel 9-aminoanthracycline, and its active metabolite

amrubicinol on human tumor cells // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1998. – V. 89. – P. 1067–1073.

101. Marrero L., Wyczechowska D., Musto A.E., Wilk A., Vashistha H., Zapata A., Walker C., Velasco-Gonzalez C., Parsons C., Wieland S., Levitt D., Reiss K., Prakash O. Therapeutic efficacy of aldoxorubicin in an intracranial xenograft mouse model of human glioblastoma // *Neoplasia.* – 2014. – V. 16. – P. 874–882.

102. Chen D.-Y., Cheng L., Dong L.-X., Chen D.Y., Cheng L., Dong L.X., He W.J., Cao H.F., Wang P., Yue C.F. Efficacy of pirarubicin for nonmuscle invasive bladder cancer: A protocol of systematic review and meta-analysis // *Medicine (Baltimore).* – 2020. – V. 99. – № 23, – e20415.

103. Broggin M. Nemorubicin // *Top. Curr. Chem.* – 2008. – № 283. – P. 191–206.

104. Kolonias D., Podona T., Savaraj N., Gate L., Cossum P., Lampidis T.J. Comparison of annamycin to adriamycin in cardiac and MDR tumor cell systems // *Anticancer Res.* – 1999. – V. 19(2A). – 1277–1283.

105. Natale R.B., Cody R.L., Simon M.S., Wheeler R.H. An in vivo and in vitro trial of aclarubicin in metastatic breast cancer: a novel approach to the study of analogs // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1993. – V. 31. – № 6. – P. 485–488.

106. Berthiaume J.M., Wallace K.B. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity // *Cell Biol. Toxicol.* – 2007. – V. 23. – P. 15–25.

107. Myers C.E., Gianni L., Simone C.B., Klecker R., Greene R. Oxidative destruction of erythrocyte ghost membranes catalyzed by the doxorubicin-iron complex // *Biochemistry.* – 1982. – V. 21. – P. 1707–1712.

108. Xu X., Persson H.L., Richardson D.R. Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron // *Mol. Pharmacol.* – 2005. – V. 68. – P. 261–271

109. Capranico G., Tinelli S., Austin C.A., Fisher M.L., Zunino F. Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1992. – V. 1132. – P. 43–48.

110. Zhang S., Liu X., Bawa-Khalfe T., Lu L.S., Lyu Y.L., Liu L.F. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity // *Nat. Med.* – 2012. – V. 18. – P. 1639–1642.

111. Roca J., Ishida R., Berger J.M., Andoh T., Wang J.C. Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1994. – V. 91. – P. 1781–1785.

112. Щекотихин, А.Е. Синтез, химические свойства и биологическая активность гетероциклических аналогов 5,12-нафтаценхинона : дис. ... д-ра хим. наук : 02.00.03 / Щекотихин Андрей Егорович. – М., 2009. – 451 с.

113. Capranico G., De Isabella P., Tinelli S., Bigioni M., Zunino F. Similar sequence specificity of mitoxantrone and VM-26 stimulation of in vitro DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II // *Biochemistry.* – 1993. – V. 32. – P. 3038–3046.

114. Novak R.F. Anthracycline and anthracenedione-based anticancer agents (Bioactive molecules) // Elsevier Science Pub. B.V., Amsterdam. – 1988. – V. 6. – 519 p.

115. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Н.И. Переводчикова. – 4-е изд. – М.: Практическая медицина, 2018. – 688 с.

116. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs – Mitoxantrone [accessed 2020 Jun 19]. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/>

117. Evison B.J., Sleebs B.E., Watson K.G., Phillips D.R., Cutts S.M. Mitoxantrone, More than Just Another Topoisomerase II Poison // *Med. Res. Rev.* – 2016. – V. 36. – P. 248–299.

118. Damiani R.M., Moura D.J., Viau C.M., Caceres R.A., Henriques J.A., Saffi J. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone // *Arch. Toxicol.* – 2016. – V. 90. – P. 2063–2076.

119. Feijen E.A.M., Leisenring W.M., Stratton K.L., Ness K.K., van der Pal H. J. H., van Dalen E.C, Armstrong G.T., Aune G. J., Green D. M, Hudson M.M, Loonen

J., Oeffinger K.C., Robison L.L., Yasui Y., Kremer L.C.M., Chow E.J. Derivation of Anthracycline and Anthraquinone Equivalence Ratios to Doxorubicin for Late-Onset Cardiotoxicity // *JAMA Oncol.* – 2019. – V. 1. – № 5(6). – P. 864-871.

120. Krapcho A.P., Petry M.L., Hacker M.P. Heterosubstituted anthracene-9,10-dione analogues. The synthesis and antitumor evaluation of 5,8-bis(aminoalkyl)amino.naphto[2,3-b]thiophene-4,9-diones // *J. Med. Chem.* – 1990. – V. 33. – № 9. – P. 2651-2655.

121. Zhang R.; Wu X.; Yalowich J.C.; Hasinoff B.B. Design, synthesis, and biological evaluation of a novel series of bisintercalating DNA-binding piperazine-linked bisanthrapyrazole compounds as anticancer agents // *Bioorg. Med. Chem.* – 2011. – V. 19. – P. 7023–7032.

122. Shchekotikhin A.E.; Dezhenkova L.G.; Tsvetkov V.B.; Luzikov Y.N.; Volodina Y.L.; Tatarskiy V., Kalinina A., Treshalin M.I., Treshalina H.M., Romanenko V.I., Kaluzhny D.N., Kubbutat M., Schols D., Pommier Y. Discovery of antitumor anthra[2,3-b]furan-3-carboxamides: Optimization of synthesis and evaluation of antitumor properties // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – V. 112. – P. 114–129.

123. Shchekotikhin A.E., Glazunova V.A., Dezhenkova L.G., Shevtsova E.K., Traven V.F., Balzarini J., Huang H.S., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. The first series of 4,11-bis[(2-aminoethyl)amino]anthra[2,3-b]furan-5,10- diones: Synthesis and anti-proliferative characteristics // *Eur. J. Med. Chem.* – 2011. – V. 46. – № 1. – P. 423–428.

124. Miglietta G., Cogoi S., Marinello J., Capranico G., Tikhomirov A.S., Shchekotikhin A.E., Xodo L.E. RNA G-quadruplexes in Kirsten ras (KRAS) oncogene as targets for small molecules inhibiting translation // *J. Med. Chem.* – 2017. – V. 14. – № 60(23). – P. 9448–9461.

125. Treshalina H.M., Romanenko V.I., Kaluzhny D.N., Treshalin M.I. Nikitin A.A., Tikhomirov A.S., Shchekotikhin A.E. Development and pharmaceutical evaluation of the anticancer Anthrafuran/Cavitron complex, a prototypic parenteral drug formulation // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2017. – V. 109. – P. 631–637.

126. Tikhomirov A.S., Shchekotikhin A.E., Lee Y.H., Chen Y.A., Yeh C.A., Tatarskiy V.V., Jr, Dezhenkova L.G., Glazunova V.A., Balzarini J., Shtil A.A., Preobrazhenskaya, M.N., Chueh P.J. Synthesis and Characterization of 4.11-Diaminoanthra[2,3-b]furan-5,10-diones: Tumor Cell Apoptosis through tNOX-Modulated NAD(+)/NADH Ratio and SIRT1 // *J. Med.Chem.* – 2015. – V. 58. – № 24. – P. 9522–9534.

127. Shchekotikhin A.E., Dezhenkova L.G., Susova O.Y., Glazunova V.A., Luzikov Y.N., Sinkevich Y.B., Buyanov V.N., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. Naphthoindole-based analogues of tryptophan and tryptamine: synthesis and cytotoxic properties // *Bioorg. Med. Chem.* – 2007. – V. 15. – P. 2651–2659.

128. Tikhomirov A.S., Lin C.-Y., Volodina Y.L., Dezhenkova L.G., Tatarskiy V.V., Schols D., Shtil A.A., Kaur P., Chueh P.J., Shchekotikhin A.E. New antitumor anthra[2,3-b]furan-3-carboxamides: Synthesis and structure-activity relationship // *Eur. J. Med. Chem.* – 2018. – V. 148. – P. 128–139.

129. Пероральные противоопухолевые средства и способы лечения онкологических заболеваний // Патент Российской Федерации № 2639479 / Щекотихин А.Е., Трещалина Е.М., Трещалин И.Д. – № 2016144754, заявл. 16.11.2016; опубл. 21.12.2017, Бюл. № 36.

130. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

131. Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) / – № 1045-73 от 06.04.1973.

132. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Council of Europe. – 1986. – ETS No. 123.

133. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. ВОЗ, 2000. Рекомендации комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований // *Качественная клиническая практика.* – 2002. – № 9. – С. 1-15.

134. Федеральный закон № 61-ФЗ от 12.04.2010. «Об обращении лекарственных средств» (ст. 10, 11, 12, 13, 28, 29, 30, 38, 39, 40, 41).

135. Приказ Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010. «Об утверждении правил лабораторной практики».

136. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Национальный научно-исследовательский совет, Комиссия по наукам о жизни, Институт ресурсов лабораторных животных // Washington D.C., National Academy Press. — 2014. — гл. 3, 4. — С. 61-1126: ил. ISBN: 0-309-05377-3.

137. ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. Введ. 02.12.2009. М.: Стандартинформ, 2010. 28 с.

138. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина РАМН: Возможности использования // Российский биотерапевтический журнал. — 2017. — №. 1. — С. 50-59.

139. Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval. Second edt.//edt. by B.A.Teicher and P.A.Andrews.-Humana Press.-Totowa.-New Jersey.-2004.-p.450;

140. Черкасова Ж.Р., Цуркан С.А., Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Трещалина Е.М. Специфичность связывания препарата АИМПИЛА с рецепторами α -фетопротейна на поверхности опухоли человека T47D из коллекции РОНЦ им. Н.Н. Блохина // Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — Т. 15. — №1. — С. 117-127.

141. Shchekotikhin A.E., Glazunova V.A., Dezhenkova L.G., Luzikov Yu.N., Buyanov V.N., Treshalina N.M., Lesnaya N.A., Romanenko V.I., Kalyuzhny D.N., Balzarini J., Agama K., Pommier Y., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. Synthesis and evaluation of new antitumor 3- aminomethyl-4,11-dihydroxynaphtho[2,3-f]indole-5,10-diones // Eur. J. Med. Chem. — 2014. — V. 86. — P. 797–805.

142. Цитотоксические линейные гетероциклические производные антрацендиона, содержащие в боковой цепи циклические диамины, активные в отношении опухолевых клеток с множественной лекарственной устойчивостью //

Патент Российской Федерации № 2412166 / Щекотихин А.Е., Преображенская М.Н., Синкевич Ю.Б., Штиль А.А., Глазунова В.А., Трещалин И.Д., Трещалина Е.М. – № 2009122411/04, заявл. 15.06.2009; опубл. 20.02.2011, Бюл. № 5.

143. Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval. Second ed./ed. by B.A.Teicher and P.A.Andrews. – Totowa. New Jersey, Humana Press. – 2004. – 450 p.

144. Freireich E.J., Gehan E.A, Rall D.P, Schmidt L.H., Skipper H.E. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man // Cancer Chemother. Repts. – 1966. – V. 50, – №4. – P. 219–244.

145. Idarubicin Side Effects. Myocardial toxicity. Medically reviewed by Drugs.com. Last updated on Oct 1, 2021. https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_621.htm.

146. Yamamoto M., Takakura A., Masuda N. Next-generation anthracycline for the management of small cell lung cancer: focus on amrubicin // Drug Des. Devel. Ther. – 2009. – № 6. – P. 189-192.

147. Nadas J., Sun D., Anthracyclines as effective anticancer drugs // Exp. Opin. Drug Discov. – 2006. – № 1. – P. 549-568.

148. Cookson M.S., Chang S.S., Lihou C., Li T., Harper S.Q., Lang Z., Tutrone R.F. Use of intravesical valrubicin in clinical practice for treatment of nonmuscleinvasive bladder cancer, including carcinoma in situ of the bladder // Ther. Adv. Urol. – 2014. – V. 6, – P. 181-191.

149. Marczak A., Denel-Bobrowska M., Łukawska M., Oszczapowicz I. Formamidinodoxorubicins are more potent than doxorubicin as apoptosis inducers in human breast cancer cells // Anticancer Res. – 2015. – V. 35. – P. 1935-1940.

150. Arcamone F.-M. Anthracycline chemistry and biology. II Sabarubicin, Top. C urr. Chem. – 2008. – V. 283. – P. 171-189.

151. Amin M., Pourshohodb A., Kheirollahb A., Afrakhtehb M., Fatollah Gholami-Borujenic F., Zeinalid M., Jamalaneef M. Specific delivery of idarubicin to HER2-positive breast cancerous cell line by trastuzumab-conjugated liposomes // J. Drug Del. Sci. Tech. – 2018. – V. 47, – P. 209-214.

152. Vicker N., Burgess L., Chuckowree I.S., Dodd R., Folkes A.J., Hardick D.J., Hancox T.C., Miller W., Milton J., Sohal S., Burgess L., Milton J., Sohal S., Wang Sh., Wren S.P., Charlton P.A. Dangerfield W., Liddle Ch., Mistry P., William A.J., Denny A. Novel angular benzophenazines: dual topoisomerase I and topoisomerase II inhibitors as potential anticancer agents // *J. Med. Chem.* – 2002. – V. 45. – № 3, – P. 721-739.

153. Беляев А.М., Багненко С.Ф., Рухляда Н.В. Внутрибрюшинная химиотерапия злокачественных опухолей брюшной полости. / – СПб., – ЭЛБИ-СПб. – 2007. – 254 с.

154. Беляева О.А., Беспалов В.Г., Сенчик К.Ю. Химиоперфузионное лечение злокачественных опухолей // *Медлайн экспресс.* – 2011. – № 2–3. – С. 58–65.

155. Клиническая фармакология по Гудману и Гилману. / Под ред. Гилмана А.Г. – Том 3. – М., Практика. – 2006. – 488 с.

156. Cunningham D., Starling N., Rao S. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer N// *Engl. J. Med.* – 2008. – V. 358. – № 1, – P. 36-46.

157. Decision Resources Survey. Oral chemotherapeutic agents: key success factors and reimbursement issues. A survey of US Oncologists and HMO pharmacy directors. June 2005.

158. Портной Ю.А., Довженко С.А., Кобрин М.Б., Переверзева Э.Р., Трещалин М.И., Голибродо В.А., Щекотихин А.Е., Фирсов А.А. Доклиническая фармакокинетика и острая токсичность антрафурана - нового противоопухолевого средства // *Хим.-фарм. журнал.* – 2020. – Т. 54. – № 2. – С. 3-7.

159. Doxorubicin Side Effects. Cardiovascular. Medically reviewed by Drugs.com. Last updated on Oct 30, 2021. https://www.drugs.com/support/editorial_policy.html#editorial-staff.

160. Mazue G., Iatropoulos M., Imondi A. Anthracyclines: a review of general and special toxicity studies // *Int. J. Oncol.* – 1995, – V. 7. – P. 713-726.

161. Funabashi H., Fujioka M., Kohchi M. Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats Effects of 2- and 4-week administration of theobromine on the testis // *J. Toxicol. Sci.* – 2000. – 25 Spec No. – P. 211-221.

162. Russell L.D., Russell J.A. Short-term morphological response of the rat testis to administration of five chemotherapeutic agents. // *Am. J. Anat.* – 1991. – V. 192. – № 2. – P. 142-168.

163. Трещалин М.И., Трещалин И.Д., Голибродо В.А., Щекотихин А.Е., Переверзева Э.Р. Экспериментальная оценка токсических свойств ЛХТА-2034 при пероральном применении // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2018. – Т. 17. – № 3, С. 81-88.

164. Tikhomirov A.S., Shtil A.A., Shchekotikhin A.E. Advances in the Discovery of Anthraquinone-Based Anticancer Agents // *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* – 2018. – V. 13. – № 2. – 159 – P. 183.

165. Volodina Y.L., Dezhenkova L.G., Tikhomirov A.S., Tatarskiy V.V., Kaluzhny D.N., Moisenovich A.M., Moisenovich M.M., Isagulieva A.K., Shtil A.A., Tsvetkov V.B., Shchekotikhin A.E. New anthra[2,3-b]furancarboxamides: A role of positioning of the carboxamide moiety in antitumor properties // *Eur. J. Med. Chem.* – 2019. – V. 165. – №1. – P. 31–45.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (ТАБЛИЦЫ)

Таблица 1 - Сравнительная эффективность субстанции и лекарственной формы антрафурана при ежедневном внутрибрюшинном введении мышам на 2-6 сутки после трансплантации внутрибрюшинно Р388. С. 53

Таблица 2 - Острая токсичность субстанции антрафурана при внутрибрюшинном введении мышам самцам BDF₁. С. 54

Таблица 3 - Острая токсичность лекарственной формы антрафурана при внутрибрюшинном введении мышам самкам BDF₁. С. 55

Таблица 4 – Острая токсичность лекарственной формы антрафурана при внутрибрюшинном введении крысам самцам Wistar. С. 56

Таблица 5 – Острая токсичность субстанции антрафурана при внутривенном введении мышам самкам BDF₁. С. 58

Таблица 6 – Острая токсичность лекарственной формы антрафурана при внутривенном введении крысам самцам Wistar. С. 59

Таблица 7 – Средняя продолжительность жизни мышей с привитым внутрибрюшинно лейкозом Р388 при однократном внутривенном введении субстанции антрафурана в диапазоне доз. С. 60

Таблица 8 – Соотношение Т/С% мышей при ежедневном 5-кратном (2-6 сутки) пероральном введении мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388 в диапазоне доз. С. 63

Таблица 9 – Соотношение Т/С при ежедневном 5-кратном (2-6 сутки) пероральном введении мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388 в диапазоне доз. С. 64

Таблица 10 – Соотношение Т/С при различных схемах перорального введения эффективных доз антрафурана мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388. С. 66

Таблица 11 – Эффективность антрафурана, введенного перорально в оптимальной схеме, в отношении эпидермальной карциномы легкого Льюис. С. 68

Таблица 12 - ТС% по среднему объёму ксенографтов рака молочной железы человека T47D после 5-кратного перорального введения антрафурана (интервал 48 ч) в разовой дозе 80 мг/кг. С. 70

Таблица 13. ТС% по среднему объёму ксенографтов рака молочной железы человека T47D после 5-кратного (интервал 48 ч) перорального введения антрафурана в разовой дозе 80 мг/кг. С. 72

Таблица 14 – Острая токсичность лекарственной формы антрафурана при пероральном введении мышам самкам BDF₁. С. 73

Таблица 15 – Острая токсичность лекарственной формы антрафурана при пероральном введении крысам самцам Wistar. С. 74

Таблица 16 – Клинический анализ мочи крыс. С. 82

Таблица 17 – Массовые коэффициенты внутренних органов крыс. С. 83

Таблица 18 – Активность АЛТ и АСТ в сыворотке крови кроликов. С. 93

Таблица 19 - Клинический анализ мочи кроликов. С. 94

Таблица 20 - Массовые коэффициенты тимуса и печени кроликов. С. 95

Таблица 21 - Основные параметры токсичности (ЛД₅₀ и МПД) лекарственной формы антрафурана для мышей и крыс при парентеральном введении. С. 104

Таблица 22 - Основные параметры токсичности (ЛД₅₀ и МПД) лекарственной формы антрафурана для мышей и крыс при внутрибрюшинном и пероральном введении. С. 104

СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (РИСУНКИ)

Рисунок 1. Средняя продолжительность жизни мышей (СПЖ) с лимфолейкозом Р-388 после внутрибрюшинного введения субстанции антрафурана. С. 52

Рисунок 2 - Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для субстанции антрафурана при внутрибрюшинном введении мышам самцам BDF₁. С. 54

Рисунок 3 – Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для лекарственной формы антрафурана при внутрибрюшинном введении мышам самкам BDF₁. С. 56

Рисунок 4 – Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для лекарственной формы антрафурана при внутрибрюшинном введении крысам-самцам Wistar. С. 57

Рисунок 5 – Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для субстанции антрафурана при внутривенном введении мышам самкам BDF₁. С. 58

Рисунок 6 – Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для лекарственной формы антрафурана при внутривенном введении крысам самцам Wistar. С. 59

Рисунок 7 – Средняя продолжительность жизни мышей при ежедневном 5-кратном (2-6 сутки) пероральном введении антрафурана мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388 в диапазоне доз. С. 62

Рисунок 8 - Средняя продолжительность жизни мышей при ежедневном 5-кратном (2-6 сутки) пероральном введении антрафурана мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388 в диапазоне доз. С. 64

Рисунок 9 - Средняя продолжительность жизни при различных схемах перорального введения антрафурана мышам с внутрибрюшинно привитым лимфолейкозом Р388. С. 65

Рисунок 10 – Изменение объема опухолевых узлов солидной карциномы легкого Льюис под действием антрафурана, введенного перорально в оптимальной схеме. С. 67

Рисунок 11 – Динамика роста подкожных ксенографтов рака молочной железы человека T47D после 5-кратного перорального введения антрафурана (интервал 48 ч) в разовой дозе 80 мг/кг. С. 70

Рисунок 12 – Динамика роста ксенографтов рака молочной железы человека T47D после 5-кратного (интервал 48 ч) введения лекарственной формы антрафурана в разовой дозе 80 мг/кг. С. 71

Рисунок 13 – Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для лекарственной формы антрафурана при пероральном введении мышам самкам BDF₁. С. 73

Рисунок 14 – Зависимость процента павших животных от дозы антрафурана и расчетные дозы (мг/кг) для лекарственной формы антрафурана при пероральном введении крысам самцам Wistar. С. 74

Рисунок 15 – Динамика массы тела крыс. С. 77

Рисунок 16 – Динамика общего количества лейкоцитов в периферической крови крыс. С. 78

Рисунок 17 – Динамика количества лимфоцитов в периферической крови крыс. С. 79

Рисунок 18 – Динамика количества эритроцитов в периферической крови крыс. С. 80

Рисунок 19 – Динамика содержания гемоглобина в периферической крови крыс. С. 80

Рисунок 20 – Динамика величины гематокрита в периферической крови крыс. С. 81

СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (МИКРОФОТОГРАФИИ)

Фото 1. Печень крысы. а – интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 20 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Очаг микронекроза вблизи портального тракта. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 30 суток после курса. Жировая дистрофия гепатоцитов вблизи триады. х 40. С. 84

Фото 2. Почка крысы. а – интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 20 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Очаг некроза извитых канальцев вблизи клубочка и сосуда. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Очаг некроза прямых канальцев в мозговой зоне. х 20. С. 84

Фото 3. Миокард крысы. а – интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 20 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Резкое полнокровие капилляров и венул. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 30 суток после курса. Отек, очаги атрофии мышечных волокон. х 20. С. 85

Фото 4. Желудок крысы. а – интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 20 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Умеренная атрофия слизистой оболочки, деструкция обкладочных клеток и покровно-ямочного эпителия, полнокровие капилляров. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Глубокая атрофия эпителия желез, атрофия, деструкция и десквамация покровно-ямочного эпителия, деструкция обкладочных клеток. х 20. С. 85

Фото 5. Поджелудочная железа крысы. а – интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 30 суток после курса. Очаг некроза ацинусов. Некроз желчных протоков. Кисты на месте деструкции протоков. Деструкция клеток в островке Лангерганса. х 20. С. 87

Фото 6. Мозг крысы. Большое полушарие. а - интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Набухание и разрыхление мягкой мозговой оболочки, вакуолизация нейропиля молекулярного слоя, отек вокруг капилляров наружной пирамидной пластинки, клетки-тени на месте пирамидных нейронов. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Клетки астроглии на месте пирамидных нейронов, микроглиальный узелок в наружной

зернистой пластинке, уменьшение количества пирамидных нейронов во внутренней пирамидной пластинке. х 20. С. 88

Фото 7. Мозжечок крысы. а - интактный контроль. х 20; б - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 1 сутки после курса. Полнокровие капилляров мягкой мозговой оболочки. Разрежение и дегенерация отдельных клеток Пуркинье. х 20; в - Антрафуран 100 мг/кг х 14. 30 сутки после курса. Очаг гиперплазии клеток Пуркинье. х 20. С. 89

Фото 8. Печень кролика. а – контроль. б - Антрафуран 2 мг/кг х 15. 1 сутки после курса. Вакуольная дистрофия гепатоцитов вокруг центральной вены. х 20; в - Антрафуран 6 мг/кг х 15. 1 сутки после курса. Тотальная вакуольная дистрофия гепатоцитов. Очаг микронекроза вблизи триады. х 20; г - Антрафуран 6 мг/кг х 15. 15 сутки после курса. Отек, очаг микронекроза, гиперплазия желчных протоков, фиброз вокруг триады. х 20. С. 96

Фото 9. Почка кролика. а – контроль, корковая зона. х 20; б - контроль, мозговая зона. х 20; в - Антрафуран 2 мг/кг х 15. 1 сутки после курса. Корковая зона. Очаги деструкции эпителия извитых канальцев. х 20; г - Антрафуран 2 мг/кг х 15. 1 сутки после курса. Мозговая зона. Гиалиновые цилиндры и клеточный детрит в прямых канальцах. х 20. С. 97

Фото 10. Сердце кролика. а – контроль. х 20; б - Антрафуран 2 мг/кг х 15. 1 сутки после курса. Очаг токсической кардиомиопатии. х 20; в - Антрафуран 6 мг/кг х 15. 15 сутки после курса. Крупные очаги отека и токсической кардиомиопатии вблизи артерии. х 20. С. 98

Фото 11. Почка кролика. Антрафуран 6 мг/кг х 15. а – 1 сутки после курса. Корковая зона. Очаги деструкции эпителия извитых канальцев. х 20; б - 15 сутки после курса. Корковая зона. Обширная зона некроза канальцев в стадии организации. х 20; в - 15 сутки после курса. Юкстамедуллярная зона. Кисты, выстланные плоским эпителием, на месте поврежденных канальцев. х 20. С. 99