

На правах рукописи

Додохова Маргарита Авдеевна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ГИБРИДНЫХ
ОЛОВООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ**

3.3.3. Патологическая физиология

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Ростов-на-Дону – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, доцент **Котиева Инга Мовлиевна**

доктор медицинских наук, доцент **Сафроненко Андрей Владимирович**

Официальные оппоненты:

Глушаков Руслан Иванович – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М.Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, подполковник медицинской службы, начальник научно-исследовательского отдела (медико-биологических исследований)

Сипров Александр Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии

Вавилин Валентин Андреевич – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики – подразделение федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, директор Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2023 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.2.318.01 при Институте «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» по адресу: 295051, Симферополь, бульвар Ленина, 5/7.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института «Медицинская академия имени С. И. Георгиевского» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» по адресу: 295051, Симферополь, бульвар Ленина, 5/7 и на сайте: <http://cfuv.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2023

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.2.318.01
доктор медицинских наук, доцент

Зяблицкая
Евгения Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. В 2021 году во всем мире было зарегистрировано около 10 миллионов смертей от онкологической патологии, и, согласно статистическим прогнозам, это число увеличится на 60% в 2040 году [Vaidya S.P. et al., 2022]. По данным отчетов региональных специализированных учреждений по оказанию онкологической помощи населению, в России ежегодно растет количество пациентов, имеющих злокачественные новообразования (ЗН) различной степени распространенности процесса [Каприн А.Д. и др., 2019, Каприн А.Д. и др., 2020]. На конец 2020 года число человек, состоящих под диспансерным наблюдением, составило около четырех миллионов [Каприн А.Д. и др., 2021].

Лекарственная терапия остается одним из основных методов лечения ЗН различной локализации и стадийности онкологического процесса [Безбородова О.А. и др., 2020]. Спектр препаратов чрезвычайно широк и включает в себя соединения с различными механизмами действия. Как правило, высокая активность противоопухолевого препарата тесно связана с его высокой токсичностью. Эффективность большинства противоопухолевых лекарственных средств (ЛС) ограничена развитием побочных нежелательных реакций и резистентности при курсовом введении.

В настоящее время в качестве кандидатов в противоопухолевые ЛС активно изучаются субстанции, в состав которых входит атом металла [Fotopoulou E. et al., 2022]. Металлосодержащие соединения благодаря отличительным особенностям могут стать универсальной платформой для рационального проектирования новых терапевтических и диагностических металлопрепаратов [Imtiyaz Y. et al., 2021]. В последние десятилетия особый интерес вызывают соединения олова (IV), относящиеся к классу металлоорганических соединений и содержащие связи «олово-углерод». Оловоорганические соединения (ООС) проявили себя как высокоэффективные антипролиферативные, противоопухолевые и антиметастатические агенты на модельных системах *in vitro* и *in vivo* [Nadia E. et al., 2021]. Органические лиганды в молекуле ООС способствуют модуляции биологической активности. Для преодоления избыточной токсичности при направленном синтезе тестируемых нами гибридных ООС произведено конструирование молекул с фрагментами 2,6-ди-трет-бутилфенола и N-(3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)-3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензамида [Мухатова Е.М. и др., 2013; Nikitin E.A. et al., 2022]. В результате первого этапа биотрансформации гибридных ООС в клетке образуется два фрагмента: биоцидный оловосодержащий и протекторный, содержащий группы пространственно затрудненных фенолов. Сложный радикал гибридных ООС обладает способностью захватывать свободные электроны и препятствовать образованию свободных радикалов и, таким образом, реализовывать свои антиоксидантные свойства [Milaeva E. et al., 2017]. Гибридная природа органических соединений олова определяет возможность двойственного характера действия данных молекул в процессе окисления субстратов.

Роль влияния антиоксидантов (АО) на рост и развитие опухолевого процесса остается предметом дискуссий [Вострикова С.М. и др., 2020]. Известно, что умеренное повышение внутриклеточного содержания активных форм кислорода (АФК) может промотировать клеточную пролиферацию и выживаемость клеток, тогда как превышение содержания АФК более определенного уровня способствует преодолению возможностей антиоксидантной защиты и, как следствие этого, развитию окислительного повреждения липидов, белков и ДНК и вторичной дисфункцией митохондрий. Степень повышения уровня АФК в опухолевых клетках коррелирует с агрессивностью течения злокачественного процесса и негативным прогнозом [Корман Д.Б. и др., 2019; Шлапакова Т.И. и др., 2020]. Установлено, что кроме антиоксидантного и детоксицирующего действия [Shpakovsky D. et al., 2014] фенолы и полифенолы могут самостоятельно проявлять избирательную токсичность в отношении опухолевых клеток в экспериментах *in vitro* [Гайнутдинов П.И. и др., 2018; Дергачева Д.И. и др., 2020].

Все вышеперечисленное позволяет считать, что комплексное доклиническое исследование *in vivo*, включающее оценку токсичности, и изучение противоопухолевой и антиметастатической активности гибридных ООС на экспериментальных моделях ЗН, с выявлением патогенетических механизмов ее развития, необходимо для расширения химиотерапевтических возможностей известной лекарственной терапии в онкологии.

Цель исследования – изучить и охарактеризовать влияние гибридных оловоорганических соединений на рост и развитие меланомы В16 и эпидермоидной карциномы легкого Lewis у мышей линии С57В1/6, оценить их токсичность; установить патогенетические механизмы реализации их противоопухолевого действия.

Задачи исследования:

1. Определить токсичность гибридных оловоорганических соединений.
2. Оценить противоопухолевую и антиметастатическую активность гибридных оловоорганических соединений.
3. Выявить эффективность комбинированного введения цисплатина и лидерных гибридных оловоорганических соединений на рост и развитие меланомы В16 и эпидермоидной карциномы легкого Lewis.
4. Выявить влияние лидерных гибридных оловоорганических соединений на митохондриальный гомеостаз и про/антиоксидантное состояние гепатоцитов и клеток первичного опухолевого узла на разных стадиях развития опухолевого процесса.
5. Описать патогенетическую схему дозозависимой инверсивной эффективности гибридных оловоорганических соединений.
6. Разработать универсальный алгоритм скринингового исследования соединений с предполагаемым противоопухолевым действием.

Научная новизна исследования. В рамках выполнения данной работы впервые проведено *in vivo* комплексное изучение инновационных агентов, потенциально обладающих противоопухолевым и антиметастатическим эффектом, в ряду новых гибридных оловоорганических соединений, содержащих фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола; продемонстрирована возможность значительного снижения токсичности оловоорганических соединений путем наращивания в молекуле протекторных антиоксидантных органических групп 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил; установлено наличие статистически значимого противоопухолевого и антиметастатического эффектов у соединения бис-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)тиолат диметиллолова (Me-3) и (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)тиолат трифениллолова (Me-5) на моделях перевиваемых опухолей мышей меланомы B16 (B16) и эпидермоидной карциномы Lewis (LLC); выявлен косвенный синергический эффект при комбинированном введении лидерных гибридных оловоорганических соединений и цисплатина на обеих моделях опухолевого роста; *in vivo* изучен патогенетический механизм действия эффективной и токсической доз соединений Me-3 и Me-5; предложен и обоснован новый методический подход – «упрощенный» универсальный алгоритм скринингового исследования активности соединений с предполагаемым противоопухолевым действием.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в выявлении принципиально новых сведений о противоопухолевой и антиметастатической активности гибридных ООС и установлении некоторых аспектов патогенетического механизма действия указанной группы соединений. В работе обобщены и проанализированы результаты исследований отечественных и зарубежных авторов по изучению антипролиферативной, противоопухолевой и антиметастатической активности оловоорганических соединений с различными лигандными группировками. Анализ фармакологической активности ряда синтезированных производных позволил выявить некоторые закономерности «структура – токсичность», «структура – специфичность», а также обосновать применение «упрощенного» алгоритма скринингового мониторинга активности соединений с предполагаемым противоопухолевым действием. Сформулированные закономерности зависимости токсичности и противоопухолевой и антиметастатической активности от структуры, а также выявление универсального лиганда могут быть использованы для создания более активных соединений с высокой избирательностью действия и безопасностью применения. Me-3 и Me-5 могут быть использованы как перспективные кандидаты в противоопухолевые средства для дальнейших модификации их химической структуры.

Практическая значимость работы состоит в обосновании новых методологических подходов доклинических исследований соединений с предполагаемым противоопухолевым действием.

Методология и методы исследования. Методология и алгоритм действий диссертационного исследования соответствуют общепринятой схеме проведения патогенетического доклинического изучения соединений с предполагаемой противоопухолевой и антиметастатической активностью.

Работа проведена в соответствии с международными протоколами по оценке токсичности Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): OECD 420 и OECD 425 [OECD, 2001; 2008] в центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств [Хабриев Р.У., 2005]. Для достижения цели и поставленных задач исследования использовали четыре гибридные субстанции, относящиеся к классу ООС (Me3, Me-4, Me-5 и АК-26) и два вида животных: крысы Wistar (самки, n=165) и мыши линии C57Bl/6 (самки, n=508), которые в ходе эксперимента были распределены на группы в соответствии с разработанным соискателем дизайном. Для оценки противоопухолевой активности тестируемых соединений и патогенетического механизма их действия использованы актуальные методы экспериментальной фармакологии и химиотерапии, биохимические и морфологические методы соответственно, которые позволили интерпретировать полученные результаты и сделать экспериментально обоснованные выводы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Введение фрагмента 2,6-ди-трет-бутилфенола в процессе направленного синтеза гибридных оловоорганических производных – эффективный способ снижения токсичности модифицированных соединений.

2. Соединения-лидеры из линейки исследованных гибридных органических производных олова бис-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)тиолат диметилолова (Me-3) и (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)тиолат трифенилолова (Me-5) имеют инверсивно зависимую от введенной дозы противоопухолевую и антиметастатическую активность, выявленную на перевиваемых опухолях мышей: меланоме B16 и эпидермоидной карциноме легкого Lewis.

3. При введении гибридных органических производных олова и цисплатина в комбинированной терапии меланомы B16 и эпидермоидной карциномы легкого Lewis наблюдается косвенный синергический противоопухолевый и антиметастатический эффект.

4. Уровень окислительного стресса и активность апоптотических процессов являются ведущими признаками в патогенетическом механизме влияния гибридных оловоорганических соединений на ранней стадии развития опухолевого процесса.

5. Реализация патогенетических механизмов противоопухолевой и антиметастатической эффективности гибридных оловоорганических соединений зависит от соотношения оловосодержащих и антиоксидантных фрагментов в молекуле и введенной дозы.

6. Применение «упрощенного» алгоритма скринингового исследования активности соединений с предполагаемым противоопухолевым действием позволит увеличить эффективность отбора перспективных соединений для углубленного изучения.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом проведенных экспериментальных исследований с использованием высокотехнологичного оборудования, современных фармакологических, токсикологических, биохимических и морфологических методов, соответствующих поставленным цели и задачам.

Материалы и основные положения диссертации представлены на Внеочередном XII Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии имени Н.Н. Трапезникова (Москва, 2021); 57th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (Chicago, 2021); VII Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2021» (Санкт-Петербург, 2021); XVI международном научном конгрессе «Рациональная фармакотерапия» (Санкт-Петербург, 2021); VI Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии с международным участием (Москва, 2021); 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2021» (Волгоград, 2021); III Объединенном научном форуме, включающем VII Съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «Белки и пептиды» и VII Съезд физиологов (Сочи, 2021); XXIX Российском Национальном Конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2022); XIII Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Казахстан, 2022); 58th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (Chicago, 2022); VIII Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи – 2022» (Санкт-Петербург, 2022); XVII Международном научном конгрессе «Рациональная фармакотерапия» (Санкт-Петербург, 2022); XXVI Российском онкологическом конгрессе – 2022 (Москва, 2022), VII Всероссийской Конференции по молекулярной онкологии с международным участием (Москва, 2022).

Апробация диссертации проведена на заседании Проблемной комиссии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 16 от 27 декабря 2022 г.).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 35 печатных работ, из них 20 в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, и 9 в научных изданиях, включенных в Перечень рецензируемых или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus, Web of Science, приравненных к ним, получено 2 патента на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 295 страницах, содержит введение, обзор литературы, материалы и методы проведенного исследования, четыре главы собственных результатов, отражающие полученные в работе данные и их обсуждение, завершается выводами и практическими рекомендациями. Представлены список сокращений, список литературы, приложения. Диссертация проиллюстрирована 61 таблицей и 77 рисунками. Библиография представлена ссылками на 355 литературных источников (133 отечественных и 222 зарубежных).

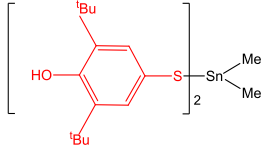
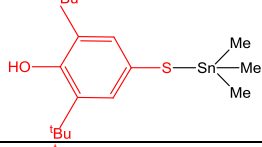
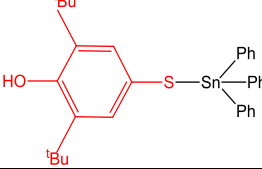
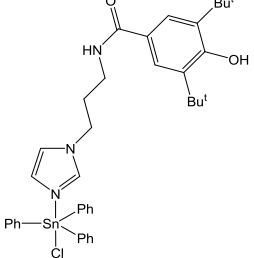
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы.

Характеристика экспериментальных животных. Исследование было выполнено на двух видах животных: крысах линии Wistar (самки) и мышах линии C57Bl/6 (самки). Экспериментальная часть работы проводилась в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, дизайн исследования одобрен локальным независимым этическим комитетом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 15/22 от 06 октября 2022).

Тестируемые соединения. В ходе направленного химического синтеза для снижения токсичности по сравнению с аналогами более простой структуры была произведена модификация молекул протекторными фрагментами 2,6-ди-трет-бутилфенола (Me-3, Me-4, Me-5) и N-(3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)-3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензамидом (AK-26) (таблица 1). Все соединения получены по известным методикам [Shpakovsky D.V. et al., 2014; Nikitin E.A. et al., 2022] и наработаны в количествах, необходимых для проведения всего цикла экспериментальной работы. Строение всех соединений подтверждено сравнением температур плавления исходных веществ и данными элементного анализа и ЯМР: ^1H , ^{13}C исследуемых соединений для доказательства их чистоты.

Таблица 1 – Структурные формулы исследуемых соединений

Лабораторный шифр исследуемых соединений	Структурная формула	Международное название
Me-3		бис(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова
Me-4		(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат)триметилолова
Me-5		(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат)трифенилолова
AK-26		комплекс хлорида трифенилолова с N-(3-(1H-имидазол-1-ил)пропил)-3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензамидом

Примечание: Обозначение радикалов: ^tBu – трет-бутил, Ph – фенил.

Определение характеристик токсичности. Исследование острой токсичности проведено на 165 крысах Wistar (самки) весом 190-210 г методами «фиксированной дозы» по протоколу OECD 420 и «вверх и вниз» по протоколу OECD 425 [OECD, 2001; OECD, 2008]. Нахождение расчетных значений токсических доз (LD₁₆, LD₅₀, LD₈₄) осуществляли, используя специальный статистический метод «пробит-анализа» по Личфилду-Уилкоксону [Прозоровский В.Б., 1994; Беленький М.Л., 1963]. Присвоение тестируемым субстанциям класса токсичности произведено по «Согласованной на глобальном уровне системе классификации опасности и маркировки химической продукции» [Хамидулина Х.Х. и др., 2014]. Оценка общей и специфической гепато-, нефро- и кардиотоксичности проведена согласно методическим рекомендациям под редакцией Каркищенко Н.Н. [Асташкин Е.И. и др., 2010]. Оценка токсического влияния гибридных оловоорганических соединений произведена по модифицированной методике Лысенкова С.П. [Лысенков С.П. и др., 1982; Ряховский А.Е. и др., 2017].

Опухолевые модели. Для выявления противоопухолевой и антиметастатической активности были использованы универсальные модели перевиваемых опухолей со спонтанным метастазированием – меланома B16 (n=254) и эпидермоидная карцинома Lewis (n=254) мышей. Штаммы опухолевых клеток получены из банка опухолевых материалов Научно-

исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Через 48 ч. после перевивки опухолевых клеток мышам-самкам линии С57В1/6 исследуемые соединения вводили внутривентриально 1 раз в сутки в течение 5 дней по классической методике, используемой для скрининга соединений с предполагаемым противоопухолевым действием [Софьина З.П. и др., 1980] в широком диапазоне доз: разовая доза (РД) составила от 30 мг/кг до 100 мг/кг, суммарная доза (СД) от 150 мг/кг до 500 мг/кг.

Исследование включало два этапа эксперимента [Трещалина Е.М. и др., 2012]. На первом этапе наблюдение за животными проводилось ежедневно до их естественной гибели с определением средней продолжительности жизни (СПЖ, сутки), увеличения продолжительности жизни (при наличии) (УПЖ, %) и суток смерти первого животного в серии. На втором этапе изучения фармакологической активности гибридных ООС. На 1 этапе были отобраны наиболее перспективные для исследования РД ООС для 2 этапа эксперимента (основного), когда на 18 (В16) и 21 сутки (LLC) после перевивки опухолевого материала животные были подвергнуты эвтаназии на гильотине.

На втором этапе на день проведения эвтаназии были определены следующие показатели: масса опухоли (М, г), процент торможения роста опухоли по массе (ТРОм, %), количество метастазов в легких на 1 мышшь (q, шт), частота метастазирования опухоли (ЧМ, %), индекс ингибирования метастазирования (ИИМ, %), степень поражения легких по методике D. Tarin и J.E. Price [Хабриев Р.У., 2005; Миронов А.Н., 2014; Tarin D. et al. 1979]. Количество метастазов в легких подсчитывали после фиксации их в растворе Боуэна (время экспозиции не менее 24 ч.) с помощью бинокулярной лупы МБС-9 (увеличение 8×2).

Морфологическое и иммуногистохимическое исследование. Патологоанатомическое вскрытие производилось по известной методике [Коптяева К.Е. и др., 2018 (крыса); Коптяева К.Е. и др., 2018 (мышшь)].

Образцы ткани органов (печень, сердце, почки, первичный опухолевый узел) для световой микроскопии и ИГХ фиксировали по классической методике; изготавливали серийные срезы толщиной 3-5 мкм. Полученные срезы образцов ткани окрашивали гематоксилином-эозином, по классическому протоколу, а также использовались специальные гистохимические окраски – по ван Гизону. Иммунофенотипирование образцов ткани органов, полученных в эксперименте, проводили с использованием первичных антител: TGFb1 (Elabscience, dilution of 1:100). Уровень экспрессии иммуногистохимических маркеров оценивался полуколичественным способом в баллах: 0 – отсутствие реакции, 1 – слабая реакция, 2 – умеренная реакция, 3 – выраженная реакция маркер-позитивных клеток. Микроскопию и фотофиксацию полученных гистологических препаратов осуществляли при 20-кратном увеличении с помощью светового микроскопа «LEICA DM4000B».

Биохимическое исследование. Для биохимической оценки функционально-метаболического состояния органов животного произведен анализ изменения следующих показателей крови: общий белок, альбумин,

мочевина, креатинин, общий и конъюгированный билирубин, активность АсАт – аспаратаминотрансферазы (КФ 2.6.1.1), АлАт-аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2), КК – креатинкиназы (КФ 2.7.3.2), ЛДГ – лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27). Для определения был использован автоматический биохимический анализатор ACCENT 300 и стандартные наборы фирмы CORMAY (Польша).

В гомогенатах печени и первичного опухолевого узла животных-опухоленосителей определяли некоторые маркеры активности ПОЛ и антиоксидантной защиты (АОЗ) стандартными методами иммуноферментного анализа (ИФА): малоновый диальдегид (МДА), глутатион восстановленный (GSH), супероксиддисмутаза (СОД) (ЕС 1.15.1.1), каталаза (ЕС 1.11.1.6), глутатионпероксидаза (ГП) (ЕС 1.11.1.9) и глутатионредуктаза (ГР) (ЕС 1.8.1.7).

Из тканей печени и первичного опухолевого узла выделены митохондрии по классической методике [Егорова М.В. и др., 2011]. В митохондриальных образцах с помощью тест-систем методом ИФА «Infinite F50 Tecan» (Austria) определяли концентрацию: цитохрома С (нг/г белка) («Bioscience», Austria), каспазы-9 (нг/г белка) («Bioscience», Austria), 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) (нг/г белка) («Enzo Life Sciences», Switzerland), МДА (нМ/г белка) («BlueGene Biotech», China); биохимическим методом – количество белка (мг/мл) – биуретовым методом («Ольвекс Диагностикум», Россия) на Wallac 1420 MultilaberCounter (Wallac Oy, Финляндия).

Методы статистической обработки результатов. Для анализа всех результатов применяли описательную статистику. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета компьютерных программ версии «Statistica 6.0». Нормальность распределения оценивали с помощью модифицированной версии метода Колмогорова-Смирнова, а именно, по методике Андерсона-Дарлинга. Оценка достоверности различий между сравниваемыми параметрами проведена помощью t-критерия Стьюдента. В качестве количественной характеристики показателей в работе приведены среднее арифметическое (M) и среднеквадратическое отклонения (M±m). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Сравнение групп производили попарно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Определение класса токсичности исследуемых соединений по протоколу OECD 420 [OECD (2001)].

1. Предварительное испытание. В предварительном испытании введение тестируемых соединений осуществляется в четырех фиксированных РД 5, 50, 300, 2000 мг/кг (рис. 1).

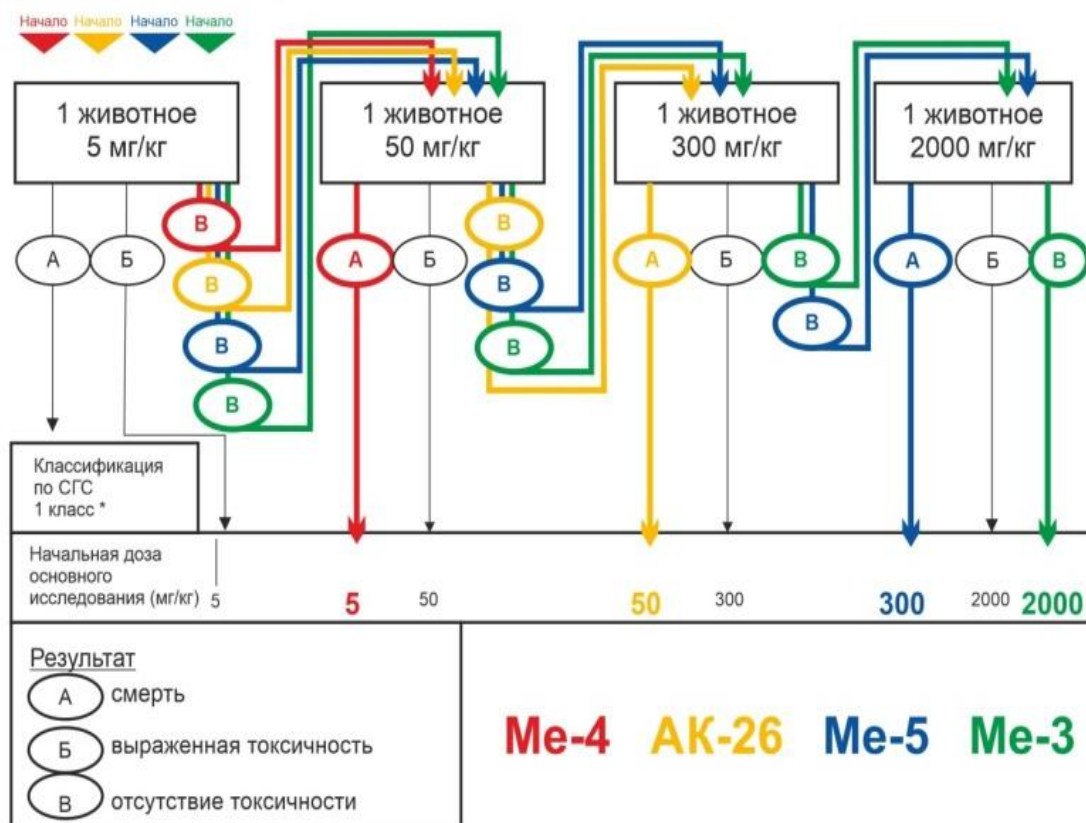


Рисунок 1 – Схема введения гибридных ООС при предварительном исследовании.

Результаты оценки летальности данной серии экспериментов приведены в таблице 2:

Таблица 2. Летальные эффекты (пало/всего) после однократного внутрижелудочного введения крысам Wistar (предварительное испытание) исследуемых субстанций (OECD 420)

Исследуемое соединение	Доза, мг/кг			
	5	50	300	2000
Me-3	0/1	0/1	0/1	0/1
Me-4	0/1	1/1	-*	-*
Me-5	0/1	0/1	0/1	1/1
AK-26	0/1	0/1	1/1	-*

Примечание: все летальные эффекты зафиксированы в течение 14 суток после введения; *данные дозы не использованы в предварительном испытании.

2. Основное испытание. Схема введения тестируемых соединений отображена на рисунке 2. В основное испытание, согласно протоколу, были выбраны начальные дозы для веществ: Me-4 – 5 мг/кг, AK-26 – 50 мг/кг, Me-5 – 300 мг/кг и Me-3 – 2000 мг/кг. Признаки интоксикации у животных были полностью идентичны по силе и продолжительности описанным в предыдущем испытании. Летальные случаи в течение 14 суток не зарегистрированы.

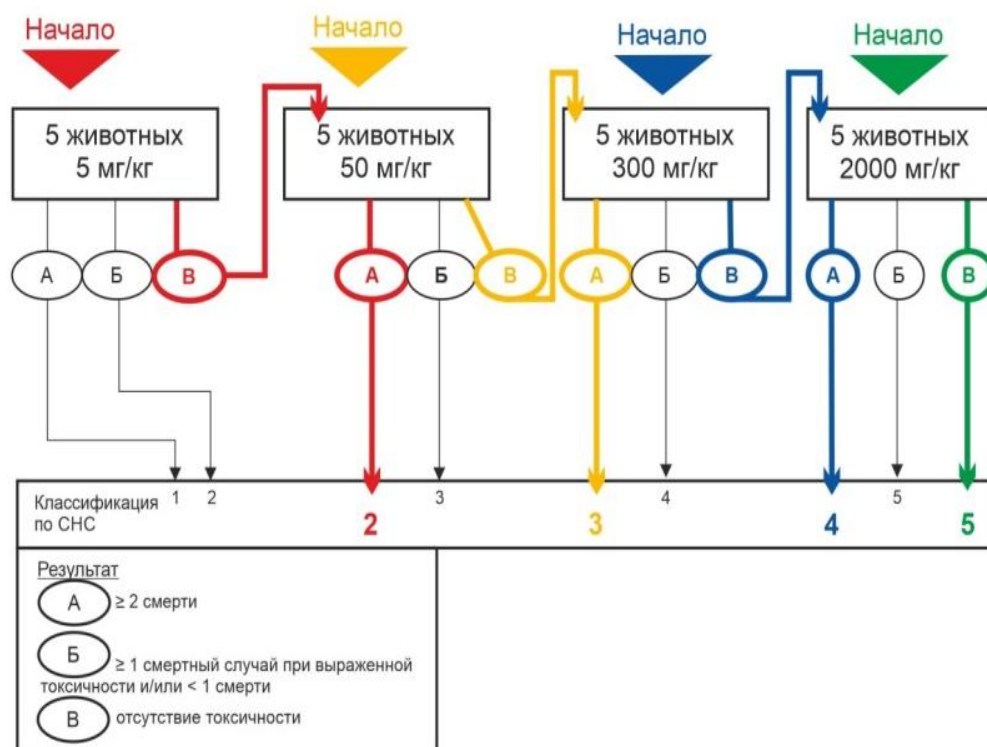


Рисунок 2 – Схема введения гибридных ООС при основном исследовании.

Следующим уровнем вводимых доз выбраны для вещества Me-4 – 50 мг/кг, АК-26 – 300 мг/кг, Me-5–2000 мг/кг.

В результате проведенного исследования сделаны следующие выводы.

Средняя доза вещества, вызывающая гибель половины животных испытуемой группы (LD_{50}), для Me-3 значительно более 2000 мг/кг, что позволяет отнести это соединение к V классу токсичности; для Me-5, классифицированного как соединение IV класса токсичности, LD_{50} составило от 300 до 2000 мг/кг; АК-26 условно отнесено к III классу токсичности; наибольшую токсичность проявило соединение Me-4: LD_{50} находится в пределах от 5 до 50 мг/кг, данные токсикометрические показатели соответствуют II классу токсичности.

Выявлены две субстанции, для которых определение количественных характеристик токсичности LD_{50} является целесообразным: Me-5 и АК-26. Значение полулетальной дозы для Me-3 условно принимается много более 2000 мг/кг (по протоколу). Соединение Me-4 по результатам оценки безопасности применения не может рассматриваться как перспективный кандидат в противоопухолевые и антиметастатические ЛС, его дальнейшее исследование на выбранных моделях нецелесообразно.

2. Определение токсикометрических характеристик соединений Me-5 и АК-26 при однократном внутрижелудочном введении по протоколу OECD 425 [OECD (2008)].

Определение для соединения Me-5. В широком диапазоне доз (от 550 мг/кг до 2000 мг/кг) с применением нестандартного коэффициента дозы произведено введение соединения Me-5. Летальные исходы регистрировались в течение 14 дней (таблица 3).

Таблица 3. Результаты по протоколу OECD 425 для соединения Me-5

Исследуемое соединение Me-5	Доза, мг/кг					
	550	650	750	850	950	2000
Животных пало/всего	0/5	0/5	0/5	1/5	3/6*	9/9*

Примечание. *— количество животных указано с учетом павших особей в предыдущих сериях введения доз.

При исследовании выявлены дозы Me-5, от которых не погибает ни одно животное (550 мг/кг, 650 мг/кг, 750 мг/кг) и доза, от которой гибнут все животные (2000 мг/кг), что необходимо для вычисления токсикометрических характеристик соединения.

Значение LD₅₀ при однократном внутрижелудочном введении Me-5 крысам линии Wistar (самки) составляет 954,0±58,3 мг/кг.

Определение для соединения АК-26. По схеме, подробно описанной для соединения Me-5, в широком диапазоне доз (от 100 мг/кг до 550 мг/кг) произведено введение соединения АК-26. Летальные исходы регистрировались в течение 14 дней (таблица 4).

Таблица 4. Результаты по протоколу OECD 425 для соединения АК-26

Исследуемое соединение АК-26	Доза, мг/кг				
	100	200	300	350	550
Животных пало/всего	0/5	0/5	2/6	3/7*	11/11*

Примечание. *— количество животных указано с учетом павших особей в предыдущих сериях введения доз.

Значение LD₅₀ при однократном внутрижелудочном введении АК-26 крысам линии Wistar (самки) составляет 353,67±31,5 мг/кг

Результаты экспериментальной работы по определению токсикометрических показателей представлены в таблице 5:

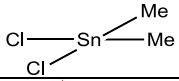
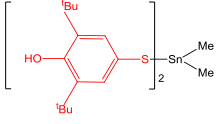
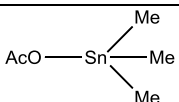
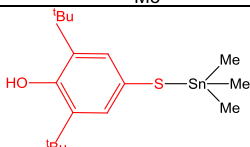
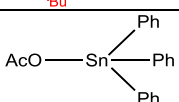
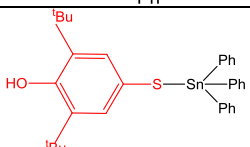
Таблица 5. Токсикометрические характеристики исследуемых соединений при однократном внутрижелудочном введении крысам Wistar (самки)

Исследуемый объект	Класс токсичности по СГС	LD ₅₀ , мг/кг	МПД, мг/кг
Me-3	V	>>> 2000	2000
Me-4	II	5 ≤ LD ₅₀ ≤ 50	-
Me-5	IV	954,0±58,3	750
АК-26	III	353,67±31,5	200

Примечания. МПД – максимально переносимая доза.

При сравнительном анализе значений LD₅₀ исследуемых соединений и их более простых аналогов [Ширяев В.И., 2010] очевидно, что уровень токсичности ООС определяется как природой заместителей R, так и лиганда L, связанного с атомом олова (таблица 6).

Таблица 6. Сравнительный анализ значений LD₅₀ для тестируемых органических соединений олова и их более простых аналогов при внутрижелудочном введении крысам Wistar

Соединения Me-3, Me-4, Me-5 и их аналоги	Название	LD ₅₀ , мг/кг
	дихлорид диметиллолова	237
	бис(3,5-ди- <i>трет</i> -бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметиллолова (Me-3)	> 2000
	ацетат триметиллолова	9
	(3,5-ди- <i>трет</i> -бутил-4-гидроксифенилтиолат)триметиллолова (Me-4)	5-50
	ацетат трифениллолова	125-150
	(3,5-ди- <i>трет</i> -бутил-4-гидроксифенилтиолат)трифениллолова (Me-5)	954

Примечание. Обозначение радикалов: Ac – ацетил, ^tBu – трет-бутил, Me – метил, Ph – фенил.

По показателям безопасности применения в качестве кандидата в противоопухолевые лекарственные средства из дальнейших исследований исключено соединение Me-4.

Важно отметить, что во всех случаях для субстанций Me-3, Me-4, Me-5, содержащих антиоксидантную 2,6-ди-*трет*-бутилфенольную группу, значения LD₅₀ зафиксированы на порядок выше, чем для соответствующих исходных оловоорганических соединений. А при наличии двух фенольных групп в молекуле токсичность снижается на 2 порядка [Додохова М.А. и др., 2021].

3. Оценка общетоксического действия, гепато-, кардио- и нефротоксичности в динамике развития интоксикации (крысы линии Wistar-самки) гибридными ООС в МПД. Для проведения экспериментальной части была выбрана максимально переносимая доза (МПД), т.е. наибольшая доза, введение которой в организм не вызывает его гибели, но сопровождается развитием симптомов интоксикации (Me-3 – 2000 мг/кг, Me-5 – 750 мг/кг, АК-26 – 200 мг/кг). Изучение общей и специфической токсичности проведено в динамике (таблица 7).

Таблица 7. Распределение животных в группах

Исследуемый объект	Группы животных в зависимости от сроков наблюдения	
	7 суток	14 суток
Ме-3	Ia (n=8)	Ib (n=8)
Ме-5	IIa (n=8)	IIb (n=8)
АК-26	IIIa (n=8)	IIIb (n=8)
Носитель (контроль)	IVa (n=6)	IVb (n=6)

Пик выраженности клинической картины интоксикации во всех опытных группах отмечен на 4-5 сутки.

Изменение веса животных использовалось нами как один из показателей, характеризующий общую токсичность (таблица 8). На 7 сутки после введения Ме-3, Ме-5, АК-26 у крыс отмечалось максимальное уменьшение веса ($p \leq 0,05$) – на 10,3%, 16,6% и 19,1% соответственно.

На 14 сутки эксперимента значения веса всех особей в опытных группах увеличивались по сравнению с предыдущим периодом наблюдения. Максимальный прирост массы был выявлен при введении Ме-3 и Ме-5 – 13,7% и 13,3% соответственно. При введении АК-26 прирост массы животных был менее выражен и составлял 6,9%.

Таблица 8. Динамика изменения массы тела

Исследуемый объект	Средний вес животных в группе, г исходный / перед эвтаназией	
	7 суток	14 суток
Ме-3	197,7±3,2/177,3±4,4	*199,5±3,8/201,5±4,5
Ме-5	200,6±3,6/167,2±5,0	196,7±5,5/189,4±3,5
АК-26	196,5±5,5/158,9±3,4	192,9±4,4/169,8±5,4
Носитель	*191,2±6,6/201,2±7,0	196,3±4,6/217,2±7,2

*Примечание:** достоверных отличий между значениями исходного веса и веса перед эвтаназией нет ($p \leq 0,05$).

Сравнительный анализ морфологических и биохимических изменений при однократном внутрижелудочном введении гибридных оловоорганических соединений в динамике развития отравления. Оценку гепато-, кардио- и нефротоксических побочных эффектов при введении МПД тестируемых соединений производили биохимическим (неспецифические маркеры) и морфологическим (специфические маркеры) методами на 7 и 14 сутки развития интоксикации.

7 сутки развития интоксикации. Умеренное повышение активности ЩФ и количества общего билирубина за счет обеих фракций (показатель прямого билирубина при введении Ме-3 составляет 49%; Ме-5 – 55,3%, АК-26 – 45,8%) свидетельствует о развитии нарушений пигментного обмена по типу печеночно-клеточной желтухи.

Максимальное снижение уровня общего белка (34,2%) было выявлено при воздействии АК-26. Количество альбумина у животных опытных групп не имело достоверных отличий. Снижение уровня белков в плазме может быть

связано, прежде всего, с уменьшением устойчивости белков крови при изменении их структуры, а также с прямым токсическим действием гибридных ООС на гепатоцит с уменьшением их синтеза и прямой потерей белков (нефротический синдром). Изменение белкового состава крови ведет к повышению концентрации токсических и биологически активных веществ и затруднению процессов детоксикации [Пашина Е.В., Золотавина М.Л., 2019].

При анализе мочевинообразовательной функции печени было отмечено повышение уровня в крови данного метаболита, что может быть связано с одновременным увеличением распада белка из-за цитолиза и снижением обезвреживающей функции почек.

Изменения биохимических маркеров на 7 сутки отравления приведены на рисунке 3.

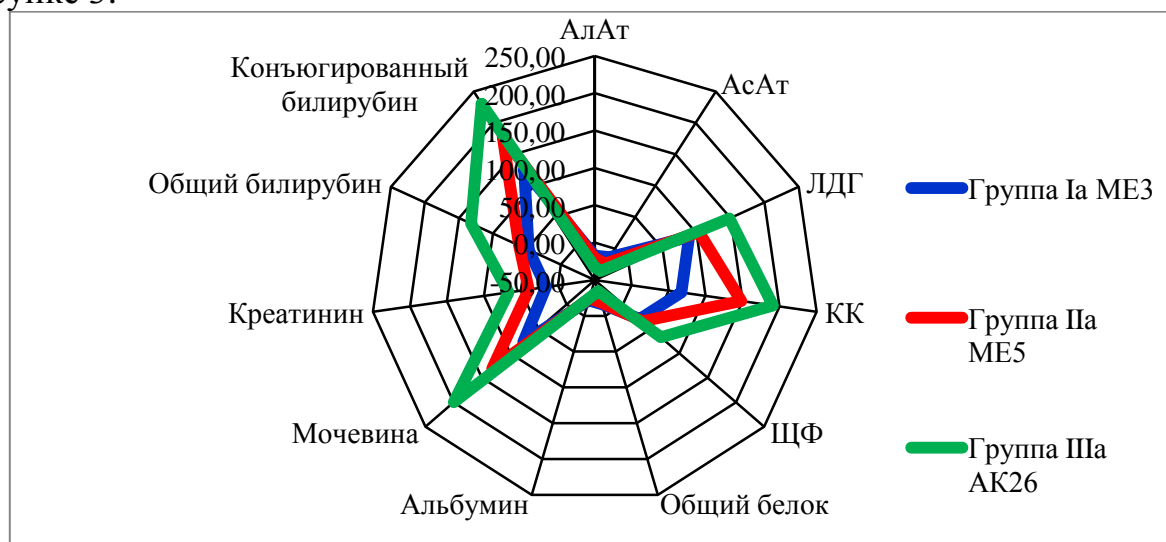


Рисунок 3 – Биохимические показатели животных на 7 сутки развития интоксикации

Приведем морфологическую структуру органов-мишеней повреждения (Ме-3 и Ме-5, 7 сутки развития интоксикации, рисунки 4 – 9).

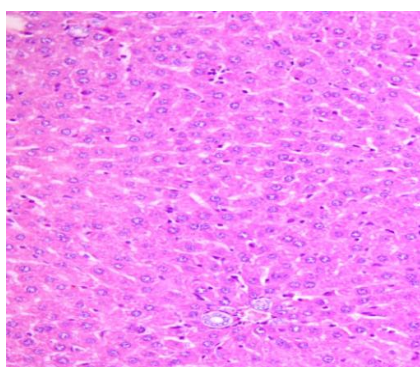


Рисунок 4 – Микроскопическая картина печени при введении Ме-3. Окрашка гематоксилином и эозином, x200.

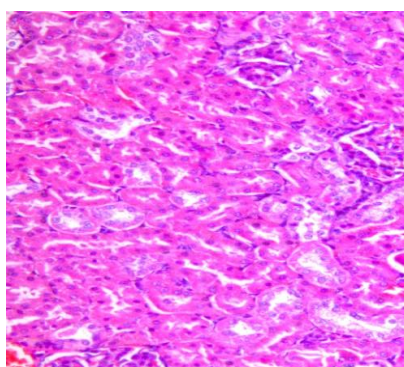


Рисунок 5 – Микроскопическая картина почки при введении Ме-3. Окрашка гематоксилином и эозином, x200.

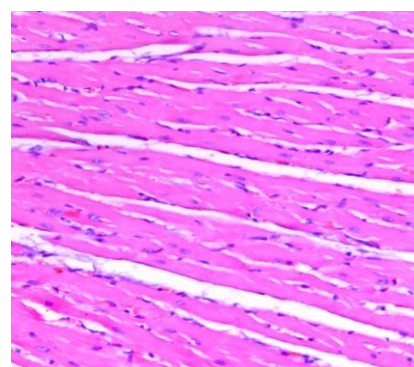


Рисунок 6 – Микроскопическая картина миокарда при введении Ме-3. Окрашка гематоксилином и эозином, x200.

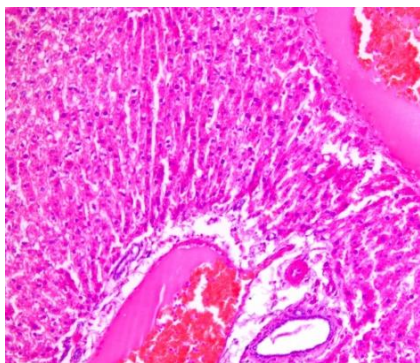


Рисунок 7 –
Микроскопическая картина печени при введении Me-5. Окраска гематоксилином и эозином, x200.

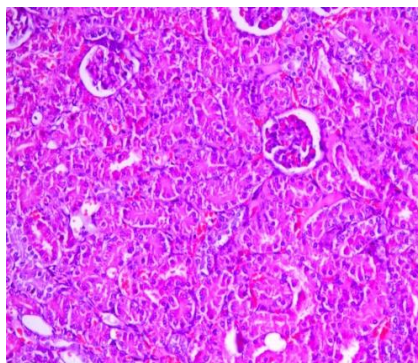


Рисунок 8 –
Микроскопическая картина почки при введении Me-5. Окраска гематоксилином и эозином, x200.

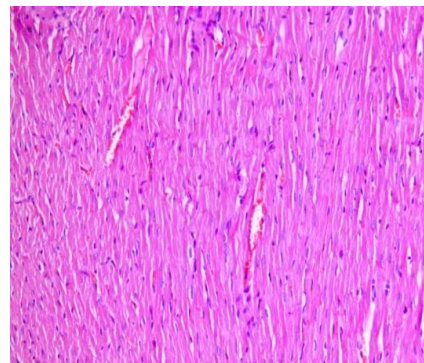


Рисунок 9 –
Микроскопическая картина миокарда при введении Me-5. Окраска гематоксилином и эозином, x200.

14 сутки развития интоксикации. При введении Me-3 увеличение активности было отмечено для ферментов образования макроэргического соединения креатинфосфата (31,7%) и обратимого превращения пировиноградной кислоты в молочную (64,1%). Умеренное повышение конъюгированного билирубина (41,1%) на фоне сохранения более стабильного уровня общего билирубина (27,9%) может быть интерпретировано как часть компенсаторно-приспособительного механизма. Изменение остальных показателей биохимического исследования либо не имело достоверных отличий от контрольных значений, либо имело вид слабой тенденции.

При введении Me-5 изменения содержания и активности неспецифических маркеров токсического процесса были значительнее, что говорит о более выраженном, чем для Me-3, влиянии Me-5 на клетку. Снижение уровня общего белка и альбумина было пропорциональным (19,1% и 17,6% соответственно). Умеренное увеличение мочевины (21,8%), креатинина (18,4%), общего билирубина за счет конъюгированной фракции свидетельствует о сохранении функционального состояния клеточного гомеостаза. Проницаемость биологических мембран и/или степень вторичного цитолиза имеет умеренную выраженность.

При введении АК-26 через 14 суток наблюдения сохраняется высокая концентрация внутриклеточных ферментов, менее выраженная для ферментов трансаминирования. Такое длительное нарушение проницаемости мембран может обуславливать высокую интенсивность и продолжительность токсического процесса.

Биохимические изменения полностью согласовывались с морфологической картиной.

На 7 сутки эксперимента у крыс при введении соединений Me-3 и Me-5 морфологические изменения в паренхиматозных органах можно отнести к низкой/умеренной степени выраженности, что связано с высокой

регенеративной способностью печеночной и почечной ткани, низкой чувствительностью кардиомиоцитов к вводимым соединениям. Структурные изменения в исследуемых органах являются потенциально обратимыми, что подтверждается функционально сохраненными процессами образования мочевины, синтеза белка и обезвреживания токсических веществ (образование прямого билирубина). На 14 сутки в паренхиматозных органах регистрируются признаки умеренно выраженной дистрофии вплоть до локального некроза клеток, преобладают очаговые альтеративные изменения. На 14 сутки наблюдения при воздействии Me-5 в паренхиматозных органах изменения более выражены по сравнению с воздействием Me-3, субтотально в паренхиме и строме отмечаются дистрофические изменения, апоптоз, некроз, скудная воспалительная инфильтрация, преобладают альтеративные процессы с минимальным воспалительным компонентом (токсический путь).

На 7 сутки при введении соединения АК-26 морфологическая картина характерна для токсического поражения органов тяжелой степени, определяются признаки декомпенсации защитных и регуляторных систем, это подтверждается биохимическими показателями (накоплением специфических метаболитов в высоких концентрациях и появлением продуктов нарушенного функционирования), что может привести к появлению вторичного (отсроченного) повреждения. При введении АК-26 на 14 сутки морфологическая картина соответствует выраженным дегенеративно-дистрофическим изменениям с превалированием некробиотических процессов (токсический путь), развивающихся субтотально в паренхиме всех исследуемых органов, в строме отмечается пролиферация фибробластов с началом развития фиброза.

По-видимому, органы-мишени определяются свойствами металла, а специфика токсического действия (сроки проявления, интенсивность повреждающего действия, скорость репарации повреждений) зависят от структуры лиганда.

4. Скрининговое изучение противоопухолевого и антиметастатического действия гибридных оловоорганических соединений

4.1. Предварительный этап исследования. Введение исследуемых соединений производили в классическом режиме по Софьиной З.П. [Софьина З.П., 1980] Регистрацию изменения общего состояния животных, летальных исходов осуществляли ежедневно до гибели всех особей.

Экспериментальные группы на I этапе исследования были сформированы следующим образом (таблица 9).

Таблица 9. Распределение испытуемых животных по группам на предварительном этапе эксперимента

Вводимые соединения и дозы	Группы животных	
	меланома В16	Эпидермоидная карцинома Lewis
Ме-3 в РД 30 мг/кг (СД 150 мг/кг)	I	1
Ме-3 в РД 50 мг/кг (СД 250 мг/кг)	II	2
Ме-3 в РД 75 мг/кг (СД 375 мг/кг)	III	3
Ме-3 в РД 100 мг/кг (СД 500 мг/кг)	IV	4
Ме-5 в РД 30 мг/кг (СД 150 мг/кг)	V	5
Ме-5 в РД 50 мг/кг (СД 250 мг/кг)	VI	6
Ме-5 в РД 75 мг/кг (СД 375 мг/кг)	VII	7
Ме-5 в РД 100 мг/кг (СД 500 мг/кг)	VIII	8
АК-26 в РД 5 мг/кг (СД 25 мг/кг)	IX	9
АК-26 в РД 10 мг/кг (СД 50 мг/кг)	X	10
АК-26 в РД 15 мг/кг (СД 75 мг/кг)	XI	11
АК-26 в РД 20 мг/кг (СД 100 мг/кг)	XII	12
Контрольная группа	XIII	13

Примечание. РД - разовая доза, СД – суммарная доза.

Во всех опытных группах частота метастазирования не отличалась от таковой у контрольных животных и составила 100%.

4.1.1. Меланома В16. При введении Ме-3 и Ме-5 в СД 150 мг/кг продолжительность жизни животных в контрольной и опытных группах достоверно не отличалась. В опытной группе II отмечена тенденция к увеличению продолжительности жизни животных, при введении аналогичной дозы в группе VI выявлен максимальный прирост данного показателя для соединения Ме-5. При введении в СД 375 мг/кг для соединения Ме-3 увеличение средней продолжительности жизни составило 41%, для соединения Ме-5, наоборот, произошло снижение данного показателя. При дальнейшем увеличении разовой дозы обеих субстанций средняя продолжительность жизни резко снижалась. Токсический эффект был отмечен при введении Ме-3 в СД 500 мг/кг и Ме-5 в двух дозах: 375 мг/кг и 500 мг/кг. Продолжительность жизни достоверно снижалась для Ме-3 на 18%, для Ме-5 – на 14% и 28% соответственно.

Снижение продолжительности жизни сопровождалось дополнительным нетипичным для меланомы В16 распространением опухоли. Наличие метастазов обнаружено в печени, почках, матке и др. Результаты проведенного экспериментального исследования показали наличие нелинейной зависимости между продолжительностью жизни экспериментальных животных и величиной вводимой дозы гибридных ООС.

Для дальнейшего изучения патогенетических механизмов дозозависимой фармакологической активности гибридных ООС соединения Ме-3 и Ме-5 были

выбраны в максимально эффективных дозах (375 мг/кг и 250 мг/кг соответственно) и токсических дозах (500 мг/кг и 375 мг/кг соответственно).

Соединение АК-26 (опытные группы IX-XIII) не оказало предполагаемой терапевтической активности на рост и развитие меланомы В16 и было исключено из дальнейшего исследования на основном этапе изучения фармакологической эффективности.

4.1.2. Эпидермоидная карцинома легких Lewis (LLC) мышей. Влияние Me-3 и Me-5 на среднюю продолжительность жизни животных приведено на рисунке 6. Введение Me3 и Me5 в суммарной дозе 150 мг/кг достоверно не изменяло среднюю величину продолжительности жизни. При увеличении дозы степень изменения данного показателя была различной. Максимально эффективными оказались дозы для Me-3 – 375 мг/кг, для Me-5 – 250 мг/кг. Наиболее высокий прирост отмечался для соединения Me-5 в дозе 250 мг/кг (29,5%).

При дальнейшем увеличении вводимой дозы наблюдался обратный эффект, снижение показателя средних значений времени жизни, более значимое для соединения Me-5 в дозе 375 мг/кг и 500 мг/кг составило 16,75% и 24,9% соответственно.

Для соединения АК-26 при введении СД 25 мг/кг, 50 мг/кг не выявлены достоверные по отношению к контрольной группе отличия продолжительности жизни. При введении СД 75 мг/кг и 100 мг/кг привело к токсическому эффекту: снижение СПЖ составило 16% и 26% соответственно.

Принимая во внимание результаты предварительного этапа изучения фармакологической активности, соединение АК-26 было исключено из последующих исследований на основном этапе.

4.2. Основной этап исследования. В результате скринингового исследования специфической активности выявлен умеренный противоопухолевый и высокий антиметастатический эффект соединения-лидера Me-3 на модели перевиваемой меланомы В16 мышей [Dodokhova M.A. et al., 2022] в максимально эффективной дозе 75 мг/кг в сутки (торможение роста опухоли по массе 27%, индекс ингибирования метастазирования 54%). При повышении разовой дозы был отмечен токсический эффект, заключающийся в активации (стимуляция роста опухоли на 15%, индекс ингибирования метастазирования 27.3%) и генерализации опухолевого процесса с появлением новых сайтов метастазирования (печень).

4.2.1. Фармакологическое исследование. На модели эпидермоидной карциномы Lewis наибольшую фармакологическую активность проявило соединение Me-5: торможение роста первичного узла на 28% и активности метастазирования – на 68% [Dodokhova M.A. et al., 2021]. Для субстанции Me-5 СД 250 мг/кг является максимально эффективной по влиянию на рост и развитие экспериментальной неоплазии. Введение ООС в высоких дозах привело к активации опухолевого процесса на всех этапах его развития: раннему и более выраженному метастазированию, а также диссеминации в нетипичные для экспериментальных моделей места (печень) и, как следствие,

ранней гибели животных (снижение средней продолжительности жизни ниже контрольных значений).

Оценку интенсивности метастазирования в легкие дополнительно провели по методике D. Tarin и J.E. Price (таблица 10).

Таблица 10. Оценка влияния Me-3 и Me-5 на тяжесть метастатического поражения по методике D. Tarin и J.E. Price

Группа	Степень поражения легких метастазами (%)				
	LCP			HCP	
	1	2	3	4	5
1a (Me-3 375мг/кг)	36	64	0	0	0
2a (Me-3 500мг/кг)	0	100	0	0	0
3a (Me-5 250мг/кг)	58	42	0	0	0
4a (Me-5 375мг/кг)	0	59	41	0	0
5a (контроль)	0	75	25	0	0

Примечание. LCP - low colonisation potential, HCP - high colonisation potential

Произведен сравнительный анализ изменения активности роста первичного опухолевого очага (ТРОм, %) и метастазирования (ИИМ, %) на двух моделях солидного роста (рисунки 10, 11).

Однонаправленный характер изменений роста первичного опухолевого узла и метастазирования позволяет предположить, что гибридные ООС являются модифицирующими агентами.

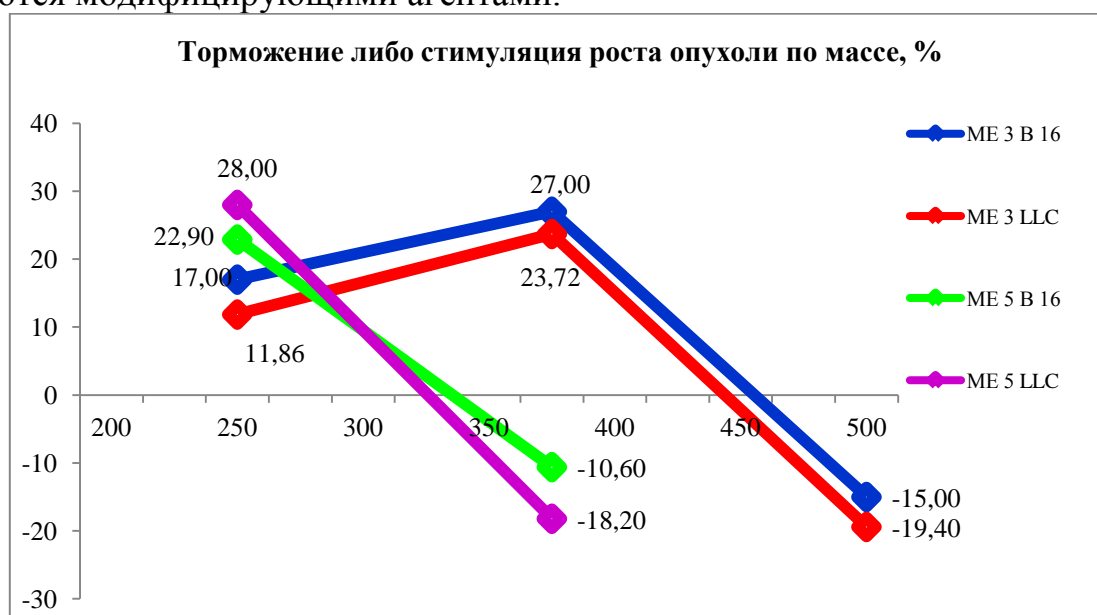


Рисунок 10 – Изменение активности роста первичного опухолевого узла (ТРОм, %) под влиянием гибридных ООС

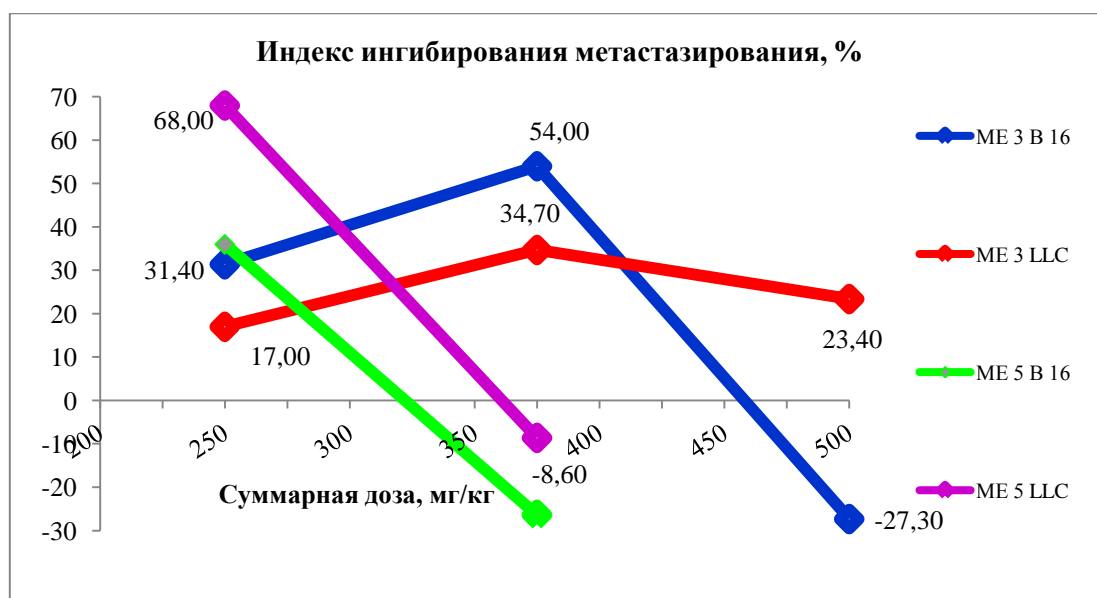


Рисунок 11 – Изменение активности метастазирования (ИИМ, %) под влиянием гибридных ООС

4.2.2. Морфологическое исследование.

Меланома В16. Комплексное морфологическое исследование первичного опухолевого узла меланомы В16 и печени показало, что при введении эффективной дозы Ме-3 (375 мг/кг) в опухолевой ткани выявлены резко выраженные дистрофические изменения с субтотальным некрозом, миксоматозом, кровоизлияниями. При ИГХ исследовании – слабая неравномерная экспрессия TGFb1 в разных полях зрения. В печени определялись очаговая гиалиново-капельная дистрофия, апоптоз и некробиоз отдельных групп гепатоцитов, встречались двухъядерные формы, эктазия центральных вен, в просвете – опухолевые клетки, очаговый перисинусоидальный фиброз, лимфоцитарные инфильтраты в строме дископлексируемых печеночных долек. При ИГХ анализе в гепатоцитах выявлена выраженная дискретная экспрессия TGFb1 и максимальная – в эндотелии сосудов и опухолевых клетках. При введении токсической суммарной дозы Ме3 (500 мг/кг) патоморфологические изменения в первичном опухолевом узле и печени носили более выраженный характер. В печени превалировали некротические процессы, в отличие от первичного опухолевого узла. Данное заключение подтверждает ИГХ реакция с высокой экспрессией TGFb1 во всех структурах органа.

При введении эффективной дозы Ме-5 (250 мг/кг) в опухолевой ткани определялись резко выраженные дистрофические изменения с субтотальным некрозом, кровоизлияниями и заместительной коллагенизацией стромы. При ИГХ исследовании в опухолевых клетках регистрировалась слабая экспрессия. В печени определялись выраженная диффузная гиалиново-капельная и жировая мелкокапельная дистрофия гепатоцитов, апоптоз и некробиоз отдельных их групп, с «мумифицированными» опухолевыми клетками в просвете синусоидов, в просвете эктазированных центральных вен выявлены единичные опухолевые клетки, дископлексируемых печеночных долек. При ИГХ

исследовании обнаружена выраженная экспрессия TGFb1 в гепатоцитах и эндотелии синусоидов, в клетках опухолевых эмболов – яркая ядерная экспрессия.

При введении токсической суммарной дозы Me-5 (375 мг/кг) в опухолевой ткани регистрировались резко выраженные дегенеративно-дистрофические изменения, дисконкомплексация опухолевых клеток, субтотальный некроз паренхимы. Иммуновизуализация в опухолевых клетках выявляла дискретную позитивную экспрессию TGFb1 с максимальной реакцией в эндотелии капилляров опухоли и зонах ее распада. В печени при введении токсической суммарной дозы Me-5 определялись выраженная диффузная гиалиново-капельная и жировая дистрофия гепатоцитов, некроз отдельных групп гепатоцитов, наличие двухядерных форм, эктазия и сближение центральных вен, в просвете четко визуализировались опухолевые клетки с формированием опухолевых эмболов, перисинусоидальный фиброз, лимфоцитарные инфильтраты в дисконкомплексированных печеночных дольках. При ИГХ исследовании в гепатоцитах, эндотелии синусоидов определялись умеренная дискретная экспрессия TGFb1 и высокая экспрессия в эндотелии более крупных сосудов.

Эпидермоидная карцинома Lewis. При введении эффективной дозы Me-3 (375 мг/кг) в первичном опухолевом узле обнаружены умеренно выраженные дистрофические изменения с локальными некрозами, кариопикнозом и кариолизисом, признаками «мумификации» опухолевых клеток. При иммуновизуализации в опухолевых клетках определялась слабо выраженная дискретная экспрессия TGFb1, максимальная в «мумифицированных клетках». В печени – очаговая микровезикулярная жировая дистрофия гепатоцитов, апоптоз и некробиоз отдельных групп с внутриклеточным отеком, эктазией синусоидов. В гепатоцитах, эндотелии синусоидов – умеренная диффузная экспрессия TGFb1, и высокая – в эндотелии более крупных сосудов.

При введении токсической суммарной дозы Me-3 (500 мг/кг) выявлены умеренно выраженные дистрофические изменения опухоли с локальными некрозами и субтотальной макровезикулярной дистрофией, «мумификацией» опухолевых клеток, фокусами вакуольной дегенерации. В опухолевых клетках – выраженная диффузная экспрессия TGFb1, максимальная – в «мумифицированных клетках». В печени определялись диффузная микровезикулярная жировая дистрофия гепатоцитов, апоптоз и некробиоз отдельных групп гепатоцитов с перисинусоидальным отеком и очаговым фиброзом, дисконкомплексация печеночных балок, субкапсулярные некрозы без реактивной воспалительной реакции, с наличием единичных микрометастазов в паренхиме. В гепатоцитах, эндотелии синусоидов, опухолевых клетках максимальная диффузная экспрессия TGFb1.

При введении эффективной дозы Me-5 (250 мг/кг) в опухолевой ткани обнаружены выраженные дистрофические изменения с фокальными некрозами, обилием «мумифицированных» клеток. В опухолевых клетках – слабо выраженная дискретная экспрессия TGFb1, наиболее выраженная в «мумифицированных клетках» первичного узла. В печени выявлялись

диффузная гиалиново-капельная и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, апоптоз и некробиоз отдельных групп клеток, дисконфлексация печеночных балок, резкая эктазия центральных вен и прилегающих синусоидов, в просвете отдельных капилляров – опухолевые клетки. В гепатоцитах, эндотелии синусоидов умеренная дискретная экспрессия TGFb1 и высокая – в эндотелии крупных сосудов, в опухолевых клетках – выраженная ядерная экспрессия этого маркера.

При введении токсической суммарной дозы Me-5 (375 мг/кг) отмечалась выраженная дегенерация опухолевой массы с субтотальными некрозами, единичными «мумифицированными» опухолевыми клетками, гидропической дистрофией и перифокальной воспалительной реакцией. В опухоли выявлена диффузная максимально резко выраженная ядерная экспрессия TGFb1. При микроскопическом исследовании печени обнаружены диффузная гиалиново-капельная и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, апоптоз, некробиоз и некроз обширных групп гепатоцитов, синусоиды очагово расширены, микрометастазы в паренхиме печени и субкапсулярно с наличием реактивной умеренно выраженной воспалительной инфильтрации. В гепатоцитах, эндотелии синусоидов – диффузная экспрессия TGFb1 и максимальная – в эндотелии крупных сосудов, выраженная ядерная экспрессия в опухолевых клетках.

Приведем некоторые иллюстрации описанных выше процессов.

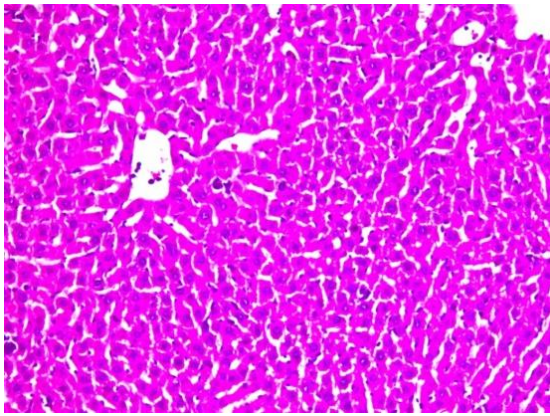


Рис. 12 – Микроскопическая картина печени при введении Me-5 в максимально эффективной суммарной дозе 250 мг/кг. Животные – мыши линии C57Bl/6 (самки), носители меланомы B16. Окраска гематоксилином и эозином, x200.

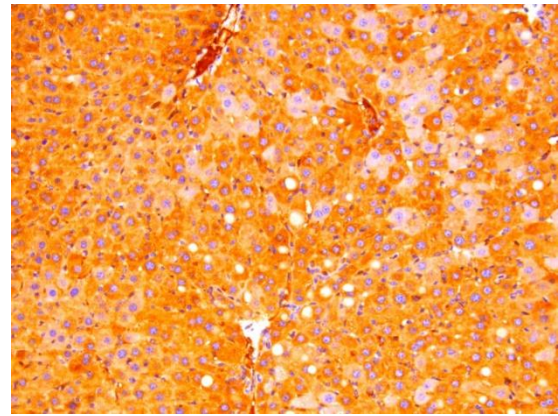


Рис. 13 – Иммуновизуализация (антитела TGFb1) в первичном опухолевом узле при введении Me-5 в максимально эффективной суммарной дозе 250 мг/кг. Животные – мыши линии C57Bl/6 (самки), носители меланомы B16, x200.

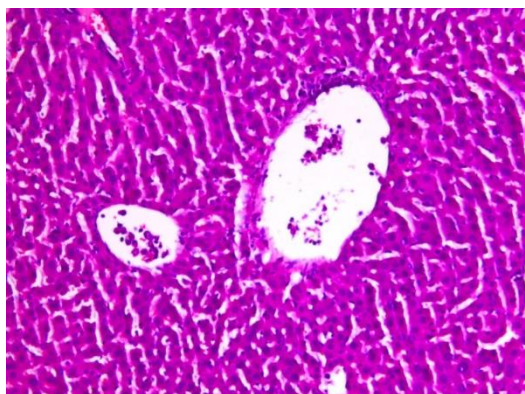


Рис. 14 – Микроскопическая картина печени при введении Me-5 в токсической суммарной дозе 375 мг/кг. Животные – мыши линии C57Bl/6 (самки), носители меланомы B16. Окраска гематоксилином и эозином, x200.

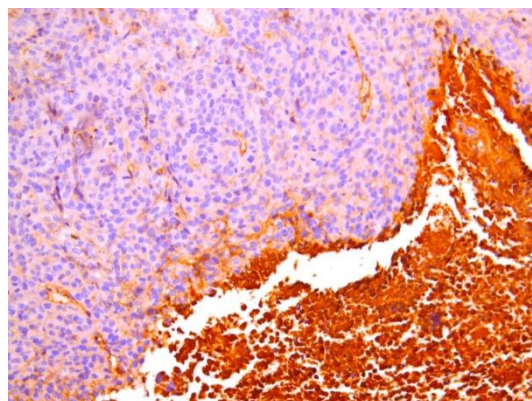


Рис. 15 – Иммуновизуализация (антитела TGFb1) в первичном опухолевом узле при введении Me-5 в токсической суммарной дозе 375 мг/кг. Животные – мыши линии C57Bl/6 (самки), носители меланомы B16, x200.

Таким образом, применение максимально эффективной дозы Me-3 (375 мг/кг) и Me-5 (250 мг/кг) при развитии меланомы B16 и эпидермоидной карциномы Lewis соответственно, по морфологическим данным показывает оптимальный терапевтический эффект этих соединений на первичный опухолевый узел и печень, тогда как дозы Me-3 (500 мг/кг) и Me-5 (375 мг/кг) вызывают выраженный токсический эффект и в первичном узле, и в паренхиме печени.

5. Комбинированное введение лидерных гибридных ООС с цисплатином.

Для комбинированной терапии препаратом сравнения был выбран лекарственный препарат цисплатин. Дизайн исследования представлен на таблице 11:

Таблица 11. Распределение животных по группам (мыши линии C57Bl/6)

Меланома B16	Эпидермоидная карцинома Lewis
Без тестируемых соединений (контрольная группа M)	Без тестируемых соединений (контрольная группа L)
ЦП, 1 мг/кг (группа сравнения 1M)	ЦП, 1 мг/кг (группа сравнения 1L)
Me-3, 37,5 мг/кг (группа сравнения-2M)	Me-3, 37,5 мг/кг (группа сравнения-2L)
Me-5, 25 мг/кг (группа сравнения-3M)	Me-5, 25 мг/кг (группа сравнения-3L)
ЦП, 1 мг/кг +Me-3, 37,5 мг/кг (опытная группа-1M)	ЦП, 1 мг/кг +Me-3, 37,5 мг/кг (опытная группа-1L)
ЦП, 1 мг/кг +Me-5, 25 мг/кг (опытная группа-2M)	ЦП, 1 мг/кг +Me-5, 25 мг/кг (опытная группа-2L)

Для опытной группы и групп сравнения изменения имели однонаправленный характер, но были разной степени выраженности. При

введении гибридных ООС в монорежиме обнаружены тенденция к уменьшению массы первичного очага и достоверный антиметастатический эффект. Введение ЦП в монорежиме оказало более выраженный противоопухолевый, по сравнению с антиметастатическим, эффект. Наибольшее подавление роста первичного очага опухоли и интенсивности метастазирования получено при комбинированном введении (1) цисплатина и Me-3 на модели меланомы B16 и (2) цисплатина и Me-5 на модели эпидермоидной карциномы Lewis. Следует отметить, что регистрируемые эффекты сохраняются на протяжении достаточно длительного времени и наблюдаются спустя 16 суток после окончания лечения.

Результаты исследования эффективности комбинированной терапии Me-3 и Me-5 с цисплатином представлены на рисунке 16.

Нами было отмечено, что влияние комбинации исследуемых веществ в малых дозах имеет более выраженный противоопухолевый и антиметастатический эффект во всех категориях оценивания, чем применение данных соединений в монорежиме. Данное наблюдение позволяет говорить о косвенном синергическом эффекте двух повреждающих противоопухолевых и антиметастатических веществ при совместном применении.

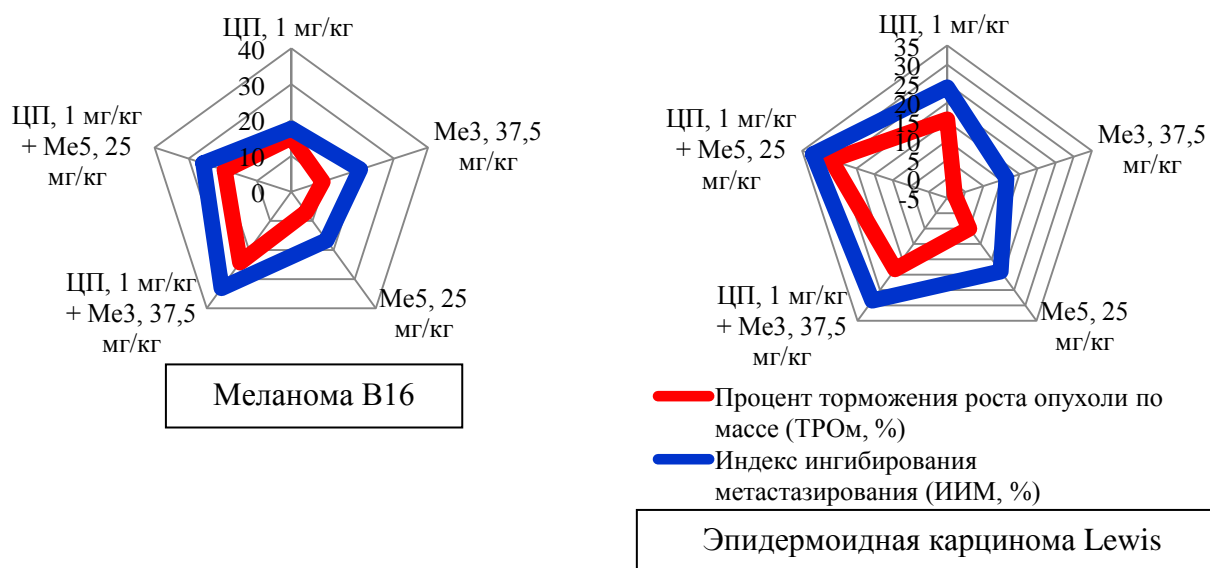


Рис. 16 – Изменение активности роста и метастазирования опухолей меланомы B16 и эпидермоидной карциномы Lewis при введении гибридных ООС в комбинированном режиме с цисплатином

6. Упрощенная методика скринингового исследования фармакологической активности оловоорганических соединений с предполагаемым противоопухолевым действием. Актуальной является стандартизация последовательности процедур, описывающих порядок действий для решения вопроса о целесообразности дальнейшего исследования конкретного ООС с предполагаемым противоопухолевым действием.

Авторская упрощенная методика скринингового исследования фармакологической активности оловоорганических соединений с предполагаемым противоопухолевым действием имеет следующие принципиально новые подходы:

1. Получение более точных данных о токсичности (класс токсичности по СГС и ориентировочное значение LD_{50}) исследуемых ООС по модифицированному протоколу OECD 420 – введение еще одной промежуточной дозы 1000 мг/кг в процедуры предварительного испытания – 1 животное), что дает возможность предположить более узкий диапазон LD_{50} для соединения Me-5.

2. Выбор разовых доз тестируемых соединений для скринингового (до естественной смерти животных) изучения необходимо проводить в зависимости от класса токсичности ООС, а не эмпирически.

3. К изучению специфической фармакологической активности на моделях злокачественных новообразований целесообразно использовать соединения IV и V классов токсичности по СГС. Возможность использовать вещества III класса токсичности по СГС в экспериментальной химиотерапии ограничена узким терапевтическим диапазоном при применении.

Сравнительный анализ классической и упрощенной методики доклинического исследования гибридных ООС представлены на рис. 16 и 17.

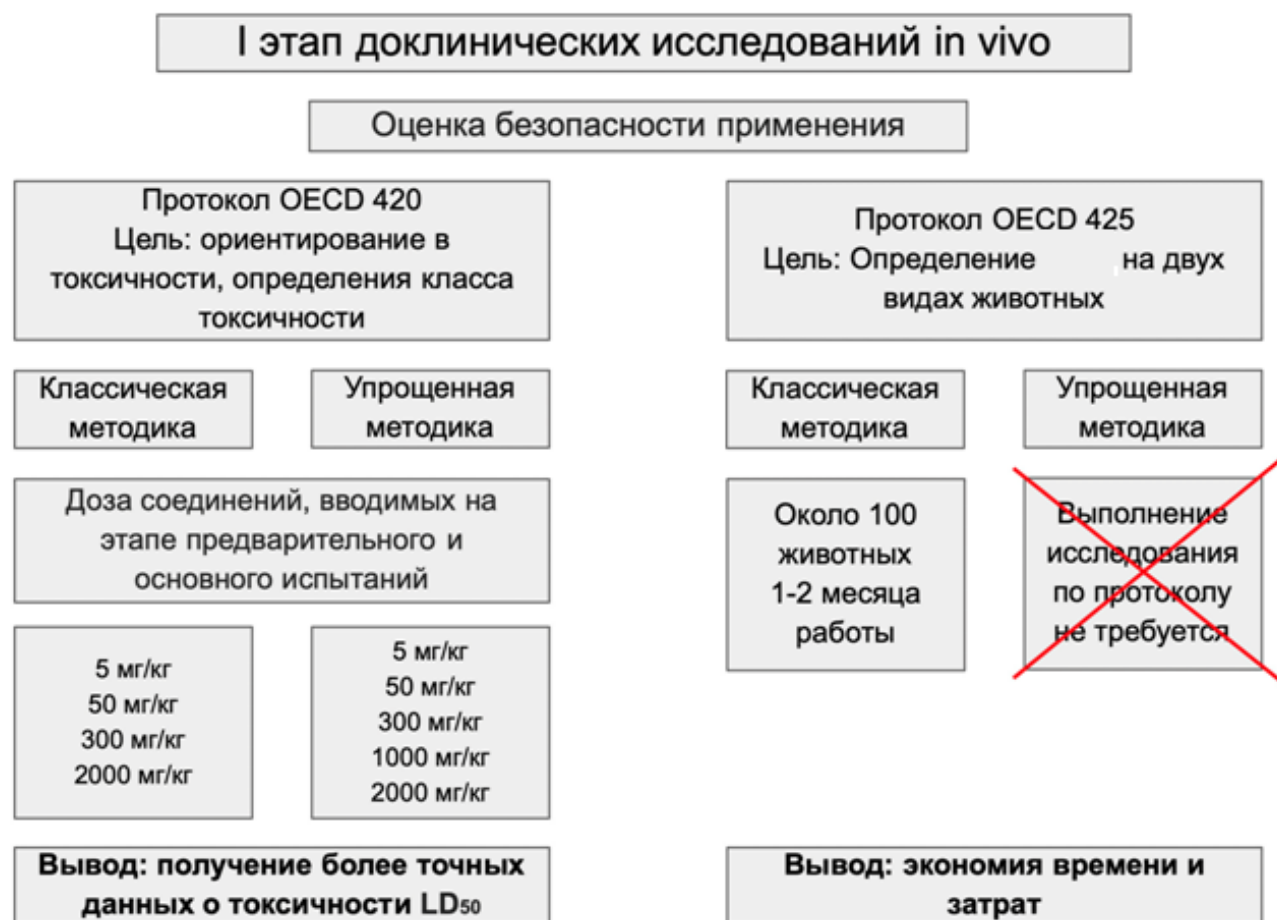


Рисунок 17 – Сравнительный анализ выполнения первого этапа доклинических исследований *in vivo* по двум методикам его проведения

На основании результатов проведения оценки безопасности применения как по классическому, так и по упрощенному варианту методики исключено из дальнейшего исследования соединение Me-4.

В целях снижения затрат на доклинические исследования выбор разовых доз тестируемых соединений для скринингового мониторинга (до естественной смерти животных) необходимо проводить в зависимости от класса токсичности ООС.

Решение о реализации доклинических исследований АК-26 продиктовано получением фундаментальных знаний о влиянии структуры ООС (длины связи между оловоорганическим и антиоксидантным фрагментом) на противоопухолевую и антиметастатическую активность при пятикратном внутрибрюшинном введении по Софьиной З.П. на моделях солидных опухолей со спонтанным метастазированием.

Для соединения III класса токсичности по СГС при ориентировке в фармакологической активности возможно использовать 3 РД – 5 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг; для соединения IV класса – 30 мг/кг, 50 мг/кг, 70 мг/кг; для соединения V класса – 50 мг/кг, 70 мг/кг, 90 мг/кг.

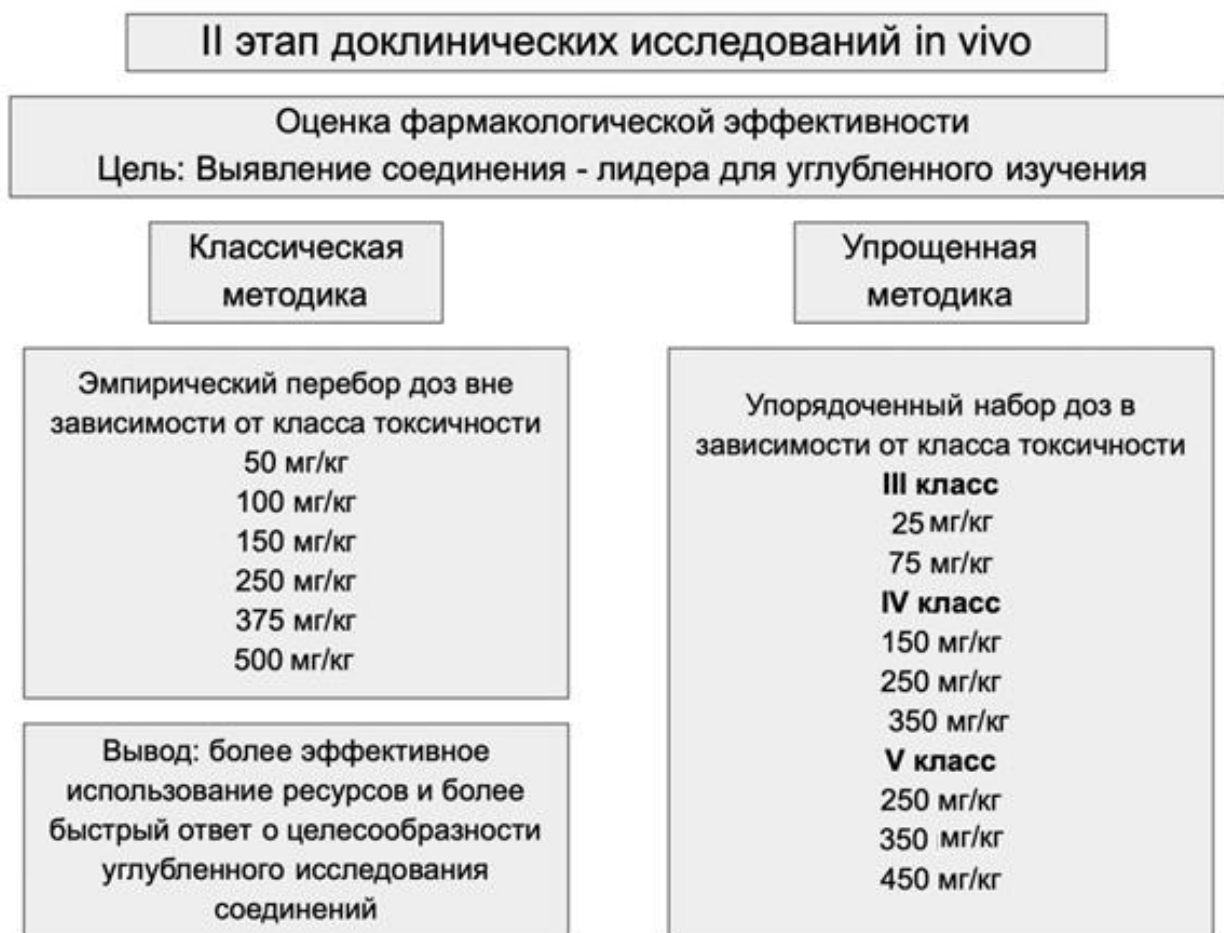


Рисунок 18 – Сравнительный анализ выполнения второго этапа доклинических исследований *in vivo* по двум методикам его проведения

В ходе скринингового изучения противоопухолевой и антиметастатической активности ООС с предполагаемым противоопухолевым действием в классическом и упрощенном варианте были получены идентичные

данные. Упрощенная методика характеризуется более высокой скоростью получения результата и меньшей трудоемкостью процесса. Данный алгоритм является универсальным и может быть использован для скринингового исследования *in vivo* большого количества соединений с предполагаемым противоопухолевым действием.

7. Изучение патогенетических механизмов противоопухолевого и антиметастатического действия лидерных гибридных ООС.

8.1. Крысы линии Wistar, 14 сутки развития интоксикации.

Проведение определений маркеров окислительного повреждения клетки, активности антиоксидантной системы и митохондриального метаболизма на интактных крысах-самках линии Wistar было произведено после однократного внутрижелудочного введения Me-3 и Me-5 в МПД в гомогенатах и митохондриальной фракции ткани печени на 14 сутки развития интоксикации.

Группы животных были сформированы следующим образом: I опытная группа – введение Me-3 в МПД 2000 мг/кг, II опытная группа – введение Me-5 в МПД 750 мг/кг, III контрольная группа – введение носителя (1% желатин) в эквивалентных объемах. Результаты данной экспериментальной серии отображены в таблицах 12 и 13.

Me-5 при остром введении не проявлял своих антиоксидантных свойств. В опытной группе II наблюдалось накопление конечного продукта ПОЛ и поврежденной митохондриальной ДНК с увеличением уровня Цит С. Me-3 в обеих сериях эксперимента проявил себя как более выраженный антиоксидант, чем Me-5. В группе I отмечено снижение содержания 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина как одного из главных маркеров повреждения митохондриальной ДНК и МДА, как конечного продукта ПОЛ, а также менее выраженная дезактивация каскадного механизма запуска апоптоза через K9 и относительная стабильность структуры мембраны митохондрии. Увеличение уровня Цит С отмечено как для Me-3, так и для Me-5. Предположительно, данное явление связано с изменением проницаемости мембраны митохондрий: образованием пор во внешней мембране и/или ее разрывом.

Проведенные исследования позволили предположить отличный от цисплатина многофакторный механизм действия ГООС, центральным звеном которых является изменение про/антиоксидантного статуса клетки и митохондриального метаболизма с активацией апоптотического пути повреждения клетки.

Для подтверждения или опровержения данной гипотезы была выполнена серия экспериментов на животных-опухоленосителях в различные сроки развития злокачественных новообразований на двух моделях экспериментальных неоплазий.

Таблица 12 – Изменения маркеров перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты тканей печени крыс (самки) линии Wistar после однократного внутрижелудочного введения Me-3 и Me-5 в максимально переносимой дозе

Группы животных	МДА, мкмоль/л	СОД, активность/г белка	КАТ, активность/г белка	GSH, мкмоль/г белка	ГП, нг/г белка	ГР, нг/г белка
I	6,13±0,91 ¹	10,43±1,3 ¹	19,57±1,5 ²	3,45±0,57 ¹	15,33±1,41 ²	31,25±3,91 ²
II	9,0±1,0 ²	15,36±2,1 ²	28,96±2,8 ²	4,08±0,81 ¹	24,15±4,63 ²	42,5±6,62 ²
III	6,86±0,72	11,87±1,8	17,65±1,32	4,12±0,68	8,66±0,85	26,61±2,25

* $p \leq 0,05$, сравнение приведено с показателем в группе контроля.

X¹ – нет достоверных отличий по отношению к контролю, X² – есть достоверные отличия по отношению к контролю.

Таблица 13 – Изменение молекулярных маркеров апоптотических процессов и МДА митохондриальной фракции печени крыс (самки) линии Wistar после однократного внутрижелудочного введения Me-3 и Me-5 в максимально переносимой дозе

Группы животных	МДА, нМ/г белка	8-OHdG, нг/г белка	Цитохром С, нг/г белка	Каспаза-9, нг/г белка
I	9,41±0,41 ¹	6,18±0,40 ²	2,11±0,23 ¹	0,39±0,04 ²
II	14,31±0,86 ²	12,26±0,98 ²	2,96±0,28 ²	0,52±0,15 ^{2,3}
III	9,2±0,70	10,74±1,09	1,96±0,19	0,47±0,05

* $p \leq 0,05$, сравнение приведено с показателем в группе контроля.

X¹ – нет достоверных отличий по отношению к контролю, X² – есть достоверные отличия по отношению к контролю, X³ – нет достоверных отличий по отношению к предыдущей опытной группе.

8.2. Животные-опухоленосители (мыши-самки линии C57Bl/6). Кроме степени агрессии опухоли, активность образования вторичных очагов зависит от метаболического состояния органов-мишеней метастатического поражения [Liu Q. et al., 2017]. Центральным звеном «метастатического органотропизма» является изменение про/антиоксидантного баланса в клетках с активацией окислительного стресса и защитных антиоксидантных систем [Basnet H. et al., 2019].

Дизайн экспериментальной части на мышах-опухоленосителях (таблица 14), описанной в данной главе, продиктован инверсией терапевтического эффекта в зависимости от дозы гибридных ООС и предположение о модифицирующем влиянии тестируемых соединений на ткани, являющиеся органотропными для метастазирования.

Таблица 14. Распределение экспериментальных животных по группам

Группы экспериментальных животных, тестируемое соединение, СД	Меланома B16	Эпидермоидная карцинома Lewis
Контрольная группа (интактные животные)	К (7)	
7 суток		
Группа сравнения (носитель)	1М (7)	1L(7)
Опытная 1-Ме3, СД 375 мг/кг	2М (7)	2L(7)
Опытная 2-Ме3, СД 500 мг/кг	3М (7)	3L(7)
Опытная 3-Ме5, СД 250 мг/кг	4М (7)	4L(7)
Опытная 4-Ме-5, СД 375 мг/кг	5М (7)	5L(7)
18 суток (М) и 21 сутки (L)		
Группа сравнения (носитель)	1М (18)	1L(21)
Опытная 1-Ме-3, СД 375 мг/кг	2М (18)	2L(21)
Опытная 2-Ме-3, СД 500 мг/кг	3М (18)	3L(21)
Опытная 3-Ме-5, СД 250 мг/кг	4М (18)	4L(21)
Опытная 4-Ме-5, СД 375 мг/кг	5М (18)	5L(21)

На 7 сутки после перевивки опухолевых клеток изучено влияние гибридных оловоорганических соединений на выраженности апоптотических процессов, уровня ПОЛ и антиоксидантной защиты в печени животных-опухоленосителей меланомы B16 и эпидермоидной карциномы Lewis до появления макроскопических метастазов (1-я неделя после перевивки опухоли), что не исключает возможности микродиссеминации опухолевого процесса. Пальпаторно у всех животных на месте введения были обнаружены первичные узелки на месте введения опухолевой взвеси.

Результаты, выявленные в данный срок наблюдения, отображены рисунке.

При развитии меланомы B16 на 7 сутки наблюдалась активация ПОЛ и увеличение активности ферментов АОЗ, что подтверждается данными других исследователей [Piskounova E. et al., 2015; Бандовкина В.А. и др., 2017].

В зависимости от дозы (рисунок 18-21; таблица 15-22) соединение Ме-3, имеющее в составе молекулы как про-, так и антиоксидантный компоненты, ведёт себя как типичный антиоксидант (суммарная доза 375 мг/кг, уменьшение МДА на 64% по сравнению с группой без лечения, 7 сутки) или как прооксидант (суммарная доза 500 мг/кг, увеличение МДА на 30% по сравнению с группой без лечения, 7 сутки). Можно предположить, что после гидролитического расщепления в клетке исследуемое соединение даёт устойчивый антиоксидантный метаболит, который активно снижает образование АФК. В условно здоровой ткани более чем в 2 раза увеличивалось количество МДА и возрастала активность ГП, при этом активность СОД, каталазы и ГР была повышена в меньшей степени.

Повышение активности в паре СОД—КАТ в опытных группах 2М (7) и 3М (7) было умеренным. Активность ГП и ГР под действием максимально эффективной противоопухолевой и антиметастатической дозы Ме-3 достоверно снижалась относительно группы без лечения на 14 и 34,8% соответственно.

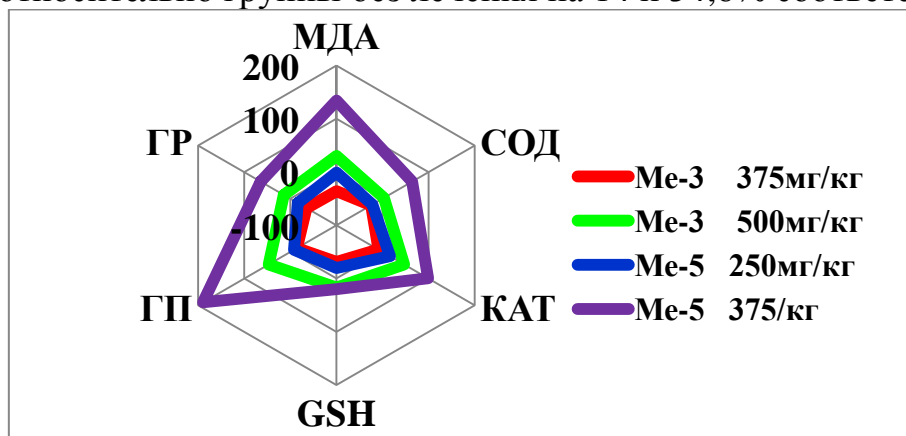


Рисунок 19 – Сравнительный анализ изменения маркеров перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты печени животных-носителей меланомы В16 через 7 суток после перевивки опухолевых клеток

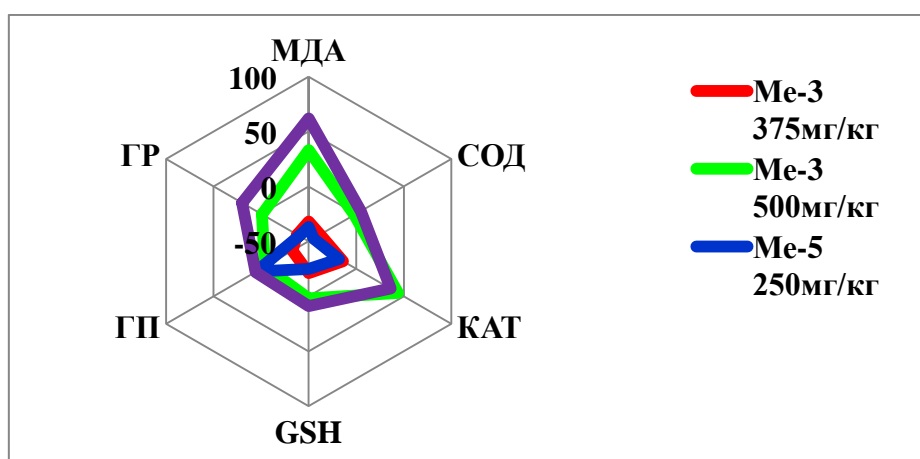


Рисунок 20 – Сравнительный анализ изменения маркеров перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты печени животных-носителей эпидермоидной карциномы Lewis через 7 суток после перевивки опухолевых клеток

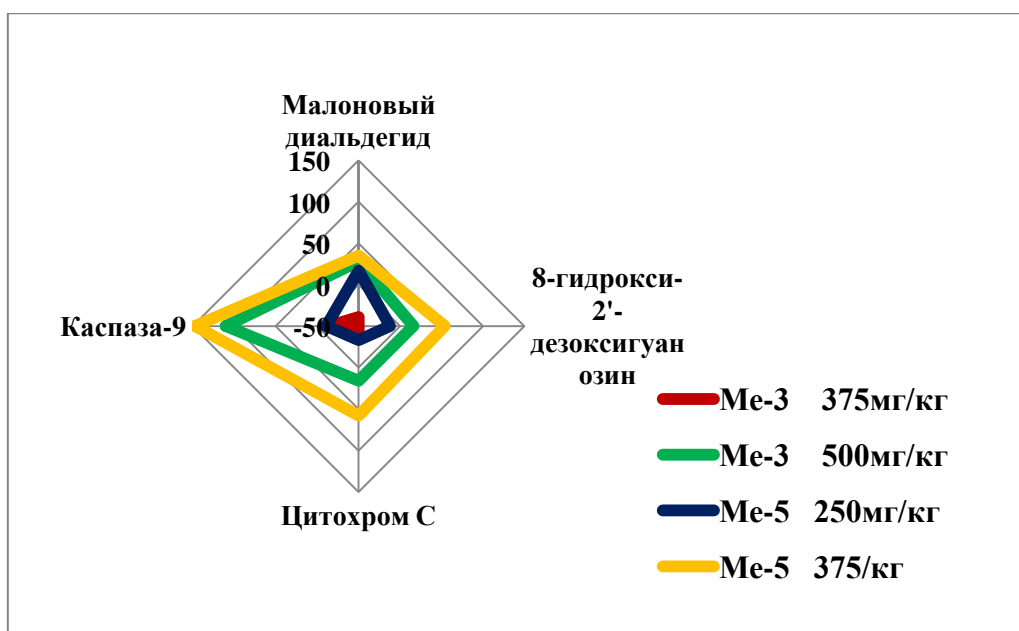


Рисунок 21 – Сравнительный анализ изменения молекулярных маркеров апоптотических процессов и МДА митохондриальной фракции печени мышей-носителей меланомы В16 через 7 суток после перевивки опухолевых клеток

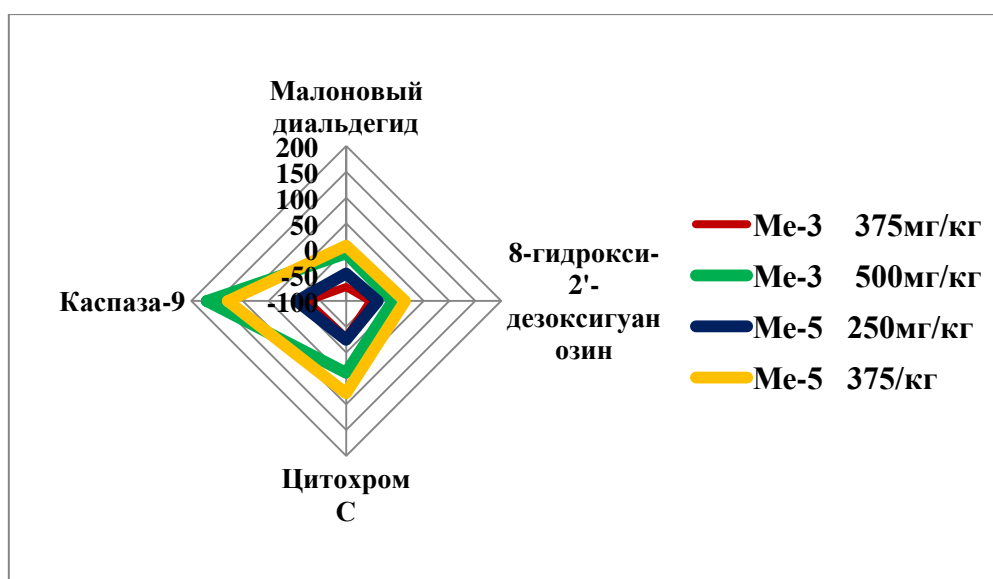


Рисунок 22 – Сравнительный анализ изменения молекулярных маркеров апоптотических процессов и МДА митохондриальной фракции печени мышей-носителей эпидермоидной карциномы Lewis через 7 суток после перевивки опухолевых клеток

Таблица 15 – Изменения маркеров перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты печени животных-носителей меланомы В16 через 18 суток после перевивки опухолевых клеток

Исследуемые маркеры	Меланома В16 без лечения Группа 1М (18)	Me-3 375 мг/кг Группа 2М (18)	Me-3 500мг/кг Группа 3М (18)	Me-5 250 мг/кг Группа 4М (18)	Me-5 375 мг/кг Группа 5М (18)
МДА, мкмоль/л,	24,1±3,8	19,25±1,74	22,8±4,1	28,15±4,21	31,2±5,4
СОД, активность/г белка	0,52±0,22	3,82±0,52*	2,12±0,31*	2,24±0,31*	1,34±0,31*
КАТ, активность/г белка	0,85±0,12	4,34±0,38*	2,65±0,12*	3,72±0,18*	1,21±0,18*
GSH, мкмоль/г белка	14,4±1,15	10,3±1,82*	12,1±2,21	15,1±1,45	16,1±3,42
ГП, нг/г белка	2,84±0,41	6,12±1,14*	10,54±1,51*	6,87±2,13*	10,35±2,54*
ГР, нг/г белка	11,14±1,35	13,65±3,47	15,14±3,65	12,23±2,15	14,35±1,85

Примечание: * $p \leq 0,05$, сравнение приведено с показателем в группе контроля.

Таблица 16 – Изменения маркеров перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты первичного опухолевого узла животных-носителей меланомы В16 через 18 суток после перевивки опухолевых клеток

Исследуемые маркеры	Меланома В16 без лечения Группа 1М (18)	Me-3 375 мг/кг Группа 2М (18)	Me-3 500мг/кг Группа 3М (18)	Me-5 250 мг/кг Группа 4М (18)	Me-5 375 мг/кг Группа 5М (18)
МДА, мкмоль/л,	12,3±2,11	15,85±2,45	16,24±3,62	21,1±3,15	23,18±2,78
СОД, активность/г белка	0,78±0,14	1,28±0,11*	0,34±0,06*	0,31±0,05*	0,28±0,04*
КАТ, активность/г белка	0,52±0,18	0,95±0,21*	0,26±0,1*	0,25±0,05*	0,31±0,08*
GSH, мкмоль/г белка	15,16±1,42	8,91±1,41*	14,8±2,0	10,7±2,15*	17,2±2,12
ГП, нг/г белка	2,25±0,11	3,18±0,24*	1,6±0,41*	2,15±0,24	1,56±0,23*
ГР, нг/г белка	4,35±0,65	5,42±0,95	4,12±1,13	4,32±1,05	3,15±0,15*

Примечание: * $p \leq 0,05$, сравнение приведено с показателем в группе контроля.

Таблица 17 – Изменение молекулярных маркеров апоптотических процессов и МДА митохондриальной фракции печени мышей-носителей меланомы В16 через 18 суток после перевивки опухолевых клеток

Группы животных	МДА, нМ/г белка	8–ОНdG, нг/г белка	Цитохром С, нг/г белка	Каспаза–9, нг/г белка
Меланома В16 без лечения Группа 1М (18)	12,92±2,6	10,11±1,7	7,34±1,4	0,21±0,04
Ме-3 375 мг/кг Группа 2М (18)	8,21±1,35*	7,22±1,5	5,37±0,5*	0,42±0,05*
Ме-3 500мг/кг Группа 3М (18)	13,25±2,75	9,12±1,74	8,18±1,74	1,14±0,01*
Ме-5 250 мг/кг Группа 4М (18)	10,7±2,64	9,36±2,52 p<0,05	8,21±1,6 p<0,05*	0,50±0,08* p<0,05*
Ме-5 375 мг/кг Группа 5М (18)	14,22±1,52*	12,34±2,11	10,32±2,14*	1,22±0,02*

Примечание: *p≤0,05, сравнение приведено с показателем в группе контроля.

Таблица 18 – Изменение молекулярных маркеров апоптотических процессов и МДА митохондриальной фракции первичного опухолевого узла мышей-носителей меланомы В16 через 18 суток после перевивки опухолевых клеток

Группы животных	МДА, нМ/г белка	8–ОНdG, нг/г белка	Цитохром С, нг/г белка	Каспаза–9, нг/г белка
Меланома В16 без лечения Группа 1М (18)	9,0±0,5	4,26±0,35	3,18±0,33	0,17±0,04
Ме-3 375 мг/кг Группа 2М (18)	15,36±2,5*	6,22±0,6*	5,22±0,44*	0,32±0,08*
Ме-3 500мг/кг Группа 3М (18)	22,45±1,26*	12,2±2,15*	6,74±1,85*	0,41±0,05*
Ме-5 250 мг/кг Группа 4М (18)	19,2±1,8*	8,73±0,64*	7,14±1,5*	0,27±0,07*
Ме-5 375 мг/кг Группа 5М (18)	32,0±3,04	14,5±3,1*	7,82±1,54*	0,45±0,04*

Примечание: *p≤0,05, сравнение приведено с показателем в группе контроля.

Таблица 19 – Изменения маркеров перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты печени животных-носителей эпидермоидной карциномы Lewis через 21 сутки после перевивки опухолевых клеток

Исследуемые маркеры	Эпидермоидная карцинома Lewis без лечения Группа 1L (21)	Me-3 375 мг/кг Группа 2L (21)	Me-3 500мг/кг Группа 3L (21)	Me-5 250 мг/кг Группа 4L (21)	Me-5 375 мг/кг Группа 5L (21)
МДА, мкмоль/л,	15,4±1,65	11,8±1,35*	16,2±2,14	16,8±3,1	17,3±2,58
СОД, активность/1г белка	0,88±0,11	1,71±0,21*	1,34±0,35*	1,57±0,41*	0,92±0,19
КАТ, активность/1г белка	0,12±0,05	1,28±0,17*	0,58±0,04*	1,12±0,07*	0,21±0,03*
GSH, мкмоль/г белка	3,14±0,52	4,18±0,47	2,88±0,61	4,78±0,15*	1,95±0,34*
ГП, нг/1г белка	2,18±0,54	3,16±0,56	3,05±0,48	2,88±0,35	3,46±0,35
ГР, нг/1г белка	6,78±1,64	9,18±1,47*	6,16±1,65	8,85±1,58	7,12±1,95

Примечание: * $p \leq 0,05$, сравнение приведено с показателем в группе контроля.

Таблица 20 – Изменения маркеров перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты первичного опухолевого узла животных-носителей эпидермоидной карциномы Lewis через 21 сутки после перевивки опухолевых клеток

Исследуемые маркеры	Эпидермоидная карцинома Lewis без лечения Группа 1L (21)	Me-3 375 мг/кг Группа 2L (21)	Me-3 500мг/кг Группа 3L (21)	Me-5 250 мг/кг Группа 4L (21)	Me-5 375 мг/кг Группа 5L (21)
МДА, мкмоль/л,	10,5±1,85	18,1±1,57*	19,2±1,63*	24,6±2,25*	31,4±3,15*
СОД, активность/1г белка	1,12±0,15	1,85±0,34*	1,23±0,28	2,15±0,32*	1,65±0,07*
КАТ, активность/1г белка	1,28±0,26	1,64±0,41	0,88±0,2	1,52±0,25	0,94±0,14
GSH, мкмоль/г белка	18,1±2,4	12,36±1,24*	17,8±1,68	10,11±1,32*	24,14±3,18*
ГП, нг/1г белка	2,66±0,5	4,16±0,56*	2,89±0,75	4,32±0,75*	3,15±1,18
ГР, нг/1г белка	8,17±1,32	10,1±1,16	6,12±1,56	6,16±1,61	7,12±2,15

Примечание: * $p \leq 0,05$, сравнение приведено с показателем в группе контроля.

Таблица 21 – Изменение молекулярных маркеров апоптотических процессов и МДА митохондриальной фракции печени мышей-носителей эпидермоидной карциномы Lewis через 21 сутки после перевивки опухолевых клеток

Группы животных	МДА, нМ/г белка	8-ОНдG, нг/г белка	Цитохром С, нг/г белка	Каспаза-9, нг/г белка
Карцинома Lewis без лечения Группа 1 L (21)	28,6±3,6	12,11±1,8	12,5±1,21	0,25±0,07
Ме-3 375 мг/кг Группа 2 L (21)	17,52±1,35*	6,14±1,42*	8,75±1,85*	0,52±0,15*
Ме-3 500мг/кг Группа 3 L (21)	26,1±4,22	13,45±2,82	11,63±2,12	0,61±0,18*
Ме-5 250 мг/кг Группа 4 L (21)	22,8±3,78	8,16±1,23*	9,36±2,31	0,88±0,16*
Ме-5 375 мг/кг Группа 5 L (21)	42,18±6,32*	18,9±3,41*	18,68±3,58*	1,57±0,12*

Примечание: * $p \leq 0,05$, сравнение приведено с показателем в группе контроля.

Таблица 22 – Изменение молекулярных маркеров апоптотических процессов и МДА митохондриальной фракции первичного опухолевого узла мышей-носителей эпидермоидной карциномы Lewis через 21 сутки после перевивки опухолевых клеток

Группы животных	МДА, нМ/г белка	8-ОНдG, нг/г белка	Цитохром С, нг/г белка	Каспаза-9, нг/г белка
Карцинома Lewis без лечения Группа 1 L (21)	23,4±2,35	16,8±2,16	9,15±1,85	0,36±0,05
Ме-3 375 мг/кг Группа 2 L (21)	27,2±1,89	17,8±1,75	12,35±1,24	0,65±0,04*
Ме-3 500мг/кг Группа 3 L (21)	35,3±3,45*	18,2±2,25	14,85±1,35*	0,88±0,11*
Ме-5 250 мг/кг Группа 4 L (21)	41,1±1,24*	24,3±1,32*	18,21±1,12*	0,97±0,24*
Ме-5 375 мг/кг Группа 5 L (21)	46,1±5,12*	28,4±4,17*	24,32±2,58*	1,12±0,18*

Примечание: * $p \leq 0,05$, сравнение приведено с показателем в группе контроля.

При анализе полученных данных очевидно, что реализация биологической активности происходит по различным схемам в зависимости от введенной суммарной дозы (рисунок 22). Инверсионная дозозависимая активность тестируемых соединений обусловлена активацией различных звеньев клеточного метаболизма. Высокий антиметастатический эффект гибридных оловоорганических соединений в большей степени обусловлен увеличением резистентности тканей-мишеней для метастазирования. Активация опухолевого процесса в сильнее связана с массивным повреждением высокомолекулярных соединений в клетке и неселективным запуском митохондриального апоптотического механизма.

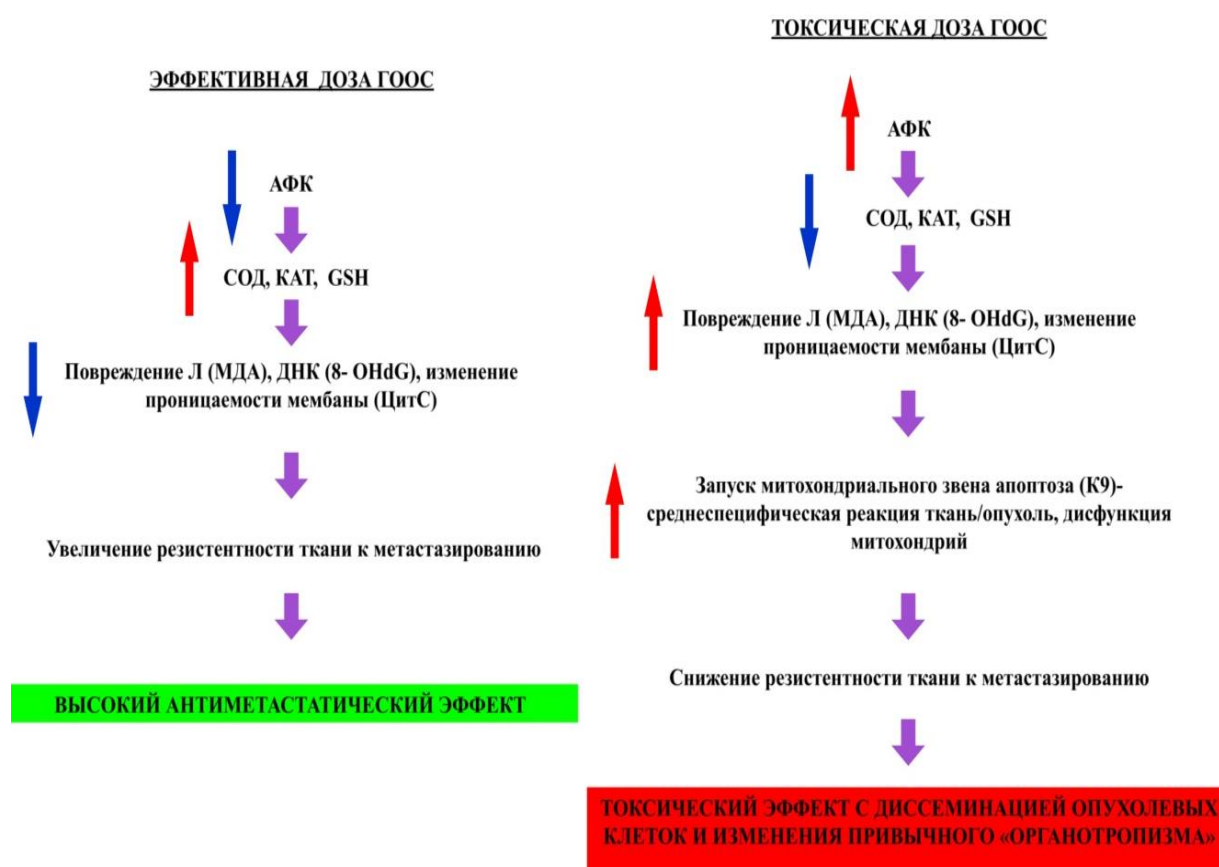


Рисунок 23 – Патогенетическая схема реализации специфической активности в эффективной и токсической суммарной дозе

Заключение. Результаты исследования позволили разработать и обосновать фундаментальные патогенетические основы применения инновационного класса оловоорганических соединений в качестве перспективных кандидатов в противоопухолевые лекарственные средства. Полученные результаты легли в основу выводов и практических рекомендаций.

ВЫВОДЫ

1. Средняя летальная доза (LD_{50}) для Me-3 составляет значительно более 2000 мг/кг, что позволяет отнести это соединение к V классу токсичности; для Me-5, классифицированного как соединение IV класса токсичности, LD_{50} составило от 954 мг/кг; АК-26 отнесено к III классу токсичности – значение полуметальной дозы около 354 мг/кг; наибольшую токсичность проявило соединение Me-4: LD_{50} находится в пределах от 5 до 50 мг/кг, данные токсикометрические показатели соответствуют II классу токсичности. Степень токсического влияния на паренхиматозные органы оценивается как умеренная при введении соединений Me-3 и Me-5; тяжелая при введении АК-26.

2. При введении гибридных органических производных олова бис-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)тиолат диметиллова (Me-3) и (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)тиолат трифениллова (Me-5) максимально эффективными на обеих моделях опухолевого роста оказались суммарные дозы 375 мг/кг и 250 мг/кг соответственно. Дальнейшее увеличение вводимой дозы приводит к инверсии с активацией диссеминации опухолевого процесса.

3. Влияние комбинации исследуемых веществ в малых дозах имеет более выраженный противоопухолевый и антиметастатический эффект во всех категориях оценивания, чем их индивидуальное применение.

4. В зависимости от введенной дозы соединение Me-3 ведёт себя как типичный антиоксидант (суммарная доза 375 мг/кг) или как прооксидант (суммарная доза 500 мг/кг). Me-5 не проявляет свой антиоксидантный потенциал в дозе 250 мг/кг, с увеличением дозы прооксидантный потенциал вырастает вдвое. Механизм развития противоопухолевого и антиметастатического эффекта зависит от введенной дозы.

5. При введении эффективной дозы гибридных оловоорганических соединений происходит снижение активности перекисного окисления и увеличение резистентности ткани печени к метастазированию. Введение токсичной дозы запускает активацию митохондриального звена апоптоза с изменением привычного «органотропизма».

6. Введение одной промежуточной дозы 1000 мг/кг в процедуры предварительного испытания дает возможность предположить более узкий диапазон LD_{50} . Применение упорядоченного подбора доз в зависимости от класса токсичности не требует исследования по протоколу 425 и при определении эффективности на моделях опухолевого роста, что позволяет сократить количество животных на 50%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для снижения неспецифической токсичности металлоорганических соединений в процессе конструирования новых противоопухолевых средств эффективным способом является введение фрагмента 2,6 -дитретбутилфенола.

2. Упрощенный алгоритм доклинического исследования соединений с предполагаемым противоопухолевым действием целесообразно использовать для изучения широкого спектра органических соединений на основе различных металлов.

3. Морфологическое исследование паренхиматозных органов в динамике развития токсического повреждения является более информативным и доказательным, чем биохимическое.

4. При изучении гибридных соединений металлов как кандидатов в противоопухолевые средства патогенетические механизмы необходимо оценивать не только в разные сроки опухолевого процесса, но и в разных дозах введения.

5. В качестве кандидатов в противоопухолевые средства целесообразно рассматривать соединения IV и V классов токсичности по СГС.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оловоорганическое соединение – ингибитор образования оксида азота (II) / Е.Р. Милаева, Д.Б. Шпаковский, Е.В. Радченко, В.А. Палюлин, Д.А. Бабков, А.В. Борисов, **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, А.А. Спасов // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2022. – № 12. – С. 2605-2611.
2. Оценка гематотоксического потенциала гибридных оловоорганических соединений при однократном внутрижелудочном введении в максимально переносимых дозах крысам линии Wistar / **М.А. Додохова**, И.М. Котиева, А.В. Сафроненко, С.В. Шлык, Н.В. Дроботя, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Рациональная фармакотерапия «Золотая осень». Сборник материалов XVII международного научного конгресса. Санкт-Петербург. – 2022. – С. 42-44.
3. Оценка динамики развития эпидермоидной карциномы Lewis при доклиническом изучении фармакологической активности гибридных оловоорганических соединений / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Е.М. Котиева, В.М. Котиева, Е.А. Никитин, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68, № S3. – С. 306-307.
4. Оценка гепатотоксического действия гибридного оловоорганического соединения и его аналога более простой структуры / М.С. Алхусейн-Кулягинова, **М.А. Додохова**, И.М. Котиева, А.В. Сафроненко, Е.М. Котиева, В.М. Котиева, Е.А. Никитин, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Вопросы онкологии. – 2022. – Т. 68, № S3. – С. 328-329.
5. Сравнительный анализ фармакологической активности бис(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат)диметиллолова при различных режимах введения на модели опухолевого роста мышей меланомы B16 / **М.А. Додохова**, И.М. Котиева, А.В. Сафроненко, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Н.В. Сухорукова, В.М. Котиева, И.М. Котиева, С.И. Старостин, Д.Б. Шпаковский, Е.А. Никитин, Е.Р. Милаева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 173, № 5. – С. 588-591.
6. Снижение интенсивности метастазирования при классическом и метронормном режиме введения гибридных оловоорганических соединений на модели эпидермоидной карциномы Lewis / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21, № S2. – С. 82.
7. Введение антиоксидантного фрагмента 2,6-ди-трет-бутилфенола при направленном синтезе оловоорганических соединений как эффективный способ снижения их гепатотоксичности / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева //

Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21, № S2. – С. 70-71.

8. Antitumor pharmacological activity of hybrid organotin compounds on the lewis epidermoid carcinoma model / **M.A. Dodokhova**, I.M. Kotieva, A.V. Safronenko, M.S. Alkhusein-kulyaginova, E.M. Kotieva, V.M. Kotieva, S.I. Starostin, Nikitin E.A., D.B. Shpakovsky, E.R. Milaeva // Journal of Clinical Oncology. – 2022. – Vol. 40, № S16. С. e15004.

9. Antitumor effectiveness of combination therapy with platinum and hybrid organotin compound on the lewis epidermoid carcinoma model with metronomic administration / I.M. Kotieva, **M.A. Dodokhova**, A.V. Safronenko, M.S. Alkhusein-Kulyaginova, E.R. Milaeva, E.A. Nikitin, D.B. Shpakovsky, E.M. Kotieva, V.M. Kotieva, S.I. Starostin // Journal of Clinical Oncology. – 2022. – Vol. 40, № S16. –С. e15080.

10. Evaluation of the pharmacological activity of hybrid organotin compounds in a b16 melanoma model in the classical and metronomic administration modes / **M.A. Dodokhova**, A.V. Safronenko, I.M. Kotieva, M.S. Alkhuseyn-Kulyaginova, D.B. Shpakovsky, E.R. Milaeva // Research Results in Pharmacology. – 2022. – Vol. 8, № 1. – P. 85-94.

11. Оценка влияния гибридных оловоорганических соединений на интенсивность метастазирования. **М.А. Додохова**, И.М. Котиева, А.В. Сафроненко, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // MedChem-Russia 2021. Материалы 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием. Волгоград. – 2021. – С. 125.

12. Изучение взаимосвязи структуры и токсичности оловоорганических соединений, содержащих фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола / М.С. Алхусейн-Кулягинова, **М.А. Додохова**, И.М. Котиева, А.В. Сафроненко, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // MedChem-Russia 2021. Материалы 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием. Волгоград. – 2021. – С. 281.

13. Антиметастатический эффект оловоорганического соединения в эксперименте / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Е.Р. Милаева, Д.Б. Шпаковский // VII Петербургский международный онкологический форум «Белые Ночи 2021». Тезисы форума. Материалы VII Петербургского международного онкологического форума. Санкт-Петербург. – 2021. – С. 51.

14. Разработка универсального алгоритма скринингового исследования металлоорганических соединений с предполагаемым противоопухолевым действием / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Рациональная фармакотерапия «Золотая осень». Сборник материалов XVI международного научного конгресса. – 2021. – С. 58-61.

15. Новый способ снижения неспецифической токсичности соединений олова – кандидатов в противоопухолевые лекарственные средства / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, М.С. Алхусейн-Кулягинова

// III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. Научные труды. Под редакцией А.Г. Габибова и М.А. Островского. – 2021. – С. 254.

16. Вторичная митохондриальная дисфункция как механизм противоопухолевого и антиметастатического действия гибридных оловоорганических соединений / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, Е.Р. Милаева, Д.Б. Шпаковский, В.Г. Трепель, М.С. Алхусейн-Кулягинова, В.М. Котиева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24, № 11. – С. 28-33.

17. Оценка гепатотоксического потенциала оловоорганических соединений, содержащих фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, Е.Р. Милаева, Д.Б. Шпаковский, Ю.М. Макаренко, В.Г. Трепель, М.С. Алхусейн-Кулягинова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24, № 8. – С. 21-27.

18. Упрощенная методика скринингового исследования оловоорганических соединений с предполагаемым противоопухолевым действием / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т. 84, № 11. – С. 20-24.

19. Влияние цисплатина и гибридного оловоорганического соединения в малых дозах на рост и метастазирование эпидермоидной карциномы Lewis в эксперименте / **М.А. Додохова**, М.С. Алхусейн-Кулягинова, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т. 84, № 8. – С. 32-35.

20. Влияние гибридного оловоорганического соединения на активность перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты тканей печени животных-опухоленосителей меланомы B16 / **М.А. Додохова**, И.М. Котиева, А.В. Сафроненко, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Н.В. Сухорукова, В.М. Котиева, Е.М. Котиева, Д.Б. Шпаковский, Е.А. Никитин, Е.Р. Милаева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 172, № 12. С. 756-759.

21. Organotin compounds as effective antimetastatic substances in the treatment of epidermoid lung carcinoma Lewis (LLC) in an experiment / **M.A. Dodokhova**, I.M. Kotieva, A.V. Safronenko, D.B. Shpakovsky, E.R. Milaeva, A.A. Shtil, E.F. Komarova, M.S. Alkhuseyn-Kulyaginova // Journal of Clinical Oncology. – 2021. – Vol. 39, № S15. – С. e15054.

22. Antimetastatic effect of organotin compounds on the model of melanoma B16 in the experiment / **M.A. Dodokhova**, I.M. Kotieva, D.B. Shpakovsky, A.V. Safronenko, E.F. Komarova, M.S. Alkhuseyn-Kulyaginova, E.R. Milaeva, A.A. Shtil // Journal of Clinical Oncology. – 2021. – Vol. 39, № S15. – С. e21564.

23. Исследование острой пероральной токсичности оловоорганических соединений, содержащих фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола /

М.А. Додохова, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, Е.Ф. Комарова, В.Г. Трепель, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Уральский медицинский журнал. – 2021. – Т. 20, № 3. – С. 73-77.

24. Гибридные оловоорганические соединения - модуляторы апоптотических процессов в печени при однократном и многократном введении крысам линии Wistar / **М.А. Додохова**, И.М. Котиева, А.В. Сафроненко, В.Г. Трепель, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Уральский медицинский журнал. – 2021. – Т. 20, № 4. – С. 18-23.

25. Оценка фармакотерапевтического потенциала оловоорганических соединений *in vivo* / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, Н.В. Сухорукова, Е.В. Ганцгорн, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Е.Ф. Комарова, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Биофармацевтический журнал. – 2021. – Т. 13, № 3. – С. 30-34.

26. Механизмы цитотоксического действия оловоорганических соединений / Е.Р. Милаева, **М.А. Додохова**, Д.Б. Шпаковский, Т.А. Антоненко, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, Е.Ф. Комарова, Е.В. Ганцгорн, М.С. Алхусейн-Кулягинова // Биомедицина. – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 88-99.

27. Оценка безопасности применения оловоорганических соединений как перспективных кандидатов в противоопухолевые лекарственные средства / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, Е.Ф. Комарова, Е.Р. Милаева, Д.Б. Шпаковский, М.С. Алхусейн-Кулягинова // Евразийский онкологический журнал. – 2021. – Т. 9, № S1. – С. 525-526.

28. Оценка кардиотоксических побочных явлений при введении оловоорганических соединений на доклиническом этапе исследования / **М.А. Додохова**, И.М. Котиева, А.В. Сафроненко, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Е.Р. Милаева, Д.Б. Шпаковский, Ю.М. Макаренко, А.Ю. Терехов, Е.О. Сергеева // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2021. – Т. 11, № 2. – С. 11-18.

29. Влияние гибридных оловоорганических соединений в максимально эффективной дозе на рост и активность метастазирования меланомы B16 у мышей линии C57BL/6 / **М.А. Додохова**, И.М. Котиева, А.В. Сафроненко, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Е.Р. Милаева, Д.Б. Шпаковский, А.Ю. Терехов, Е.О. Сергеева // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2021. – Т. 11, № 3. – С. 12-17.

30. Антиметастатическая эффективность органического соединения олова в классическом и метрономном режиме введения на модели меланомы B16 / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, М.С. Алхусейн-Кулягинова, Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Успехи молекулярной онкологии. – 2021. – Т. 8, № S4. – С. 127.

31. Оценка кардиотоксичности гибридных оловоорганических соединений с антиоксидантным фенольным фрагментом / **М.А. Додохова**, А.В. Сафроненко, И.М. Котиева, М.С. Алхусейн-Кулягинова,

Д.Б. Шпаковский, Е.Р. Милаева // Успехи молекулярной онкологии. – 2021. – Т. 8, № S4. – С. 127.

32. Impact of organotin compounds on the growth of epidermoid Lewis carcinoma / **M.A. Dodokhova**, A.V. Safronenko, I.M. Kotieva, M.S. Alkhuseyn-Kulyaginova, D.B. Shpakovsky, E.R. Milaeva // Research Results in Pharmacology. – 2021. – Vol. 7, № 4. – P. 81-88.

33. Macroheterocyclic compounds - a key building block in new functional materials and molecular devices / Koifman O.I., Ageeva T.A., Beletskaya I.P., Averin A.D., Yakushev A.A., Tomilova L.G., Dubinina T.V., Tsivadze A.Yu., Gorbunova Yu.G., Martynov A.G., Konarev D.V., Khasanov S.S., Lyubovskaya R.N., Lomova T.N., Korolev V.V., Zenkevich E.I., Blaudeck T., von Borczyskowski Ch., Zahn D.R.T., Mironov A.F. et al. // Macroheterocycles. –2020. – Vol. 13, № 4. – P. 311-467.

Методические рекомендации и авторские свидетельства

1. Патент № 2762730 С1, Российская Федерация, МПК Средство для ингибирования метастазирования в легких: заявл. № 2021108737 от 30.03.2021, опубл. 22.12.2021 / Милаева Е.Р., Шпаковский Д.Б., **Додохова М.А.**, Котиева И.М., Сафроненко А.В., Алхусейн-Кулягинова М.С.; заявитель Милаева Е.Р., **Додохова М.А.**

2. Патент № 2765955 С1, Российская Федерация, МПК Средство для ингибирования метастазирования в легких: :заявл. №2021108740 от 30.03.2021, опубл. 07.02.2022 / Милаева Е.Р., Шпаковский Д.Б., **Додохова М.А.**, Котиева И.М., Сафроненко А.В., Алхусейн-Кулягинова М.С.; заявитель Милаева Е.Р., **Додохова М.А.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

8-OHdG	– 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина
GSH	– восстановленный глутатион
OECD	– Organisation for Economic Co-operation and Development (Организация экономического сотрудничества и развития)
АО	–антиоксиданты
АОЗ	–антиоксидантная защита
АОС	–антиоксидантная система
АФК	– активные формы кислорода
ВВ	– вспомогательные вещества
ГП	– глутатионпероксидаза
ГР	– глутатионредуктаза
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЗН	– злокачественные новообразования
ИГХ	– иммуногистохимическое исследование
ИИМ	– индекс ингибирования метастазирования
ИК	– инфракрасная спектроскопия
ЛП	– лекарственные препараты
ЛС	– лекарственные средства
ЛФ	– лекарственной формы
МДА	– малоновый диальдегид
МПД	– максимально переносимая доза
ООС	– оловоорганические соединения
РД	– разовая доза
СГС	– согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химических веществ
СД	– суммарная доза
СОД	– супероксиддисмутаза
СРО	– свободно-радикальное окисление
ТРОм	– торможения роста опухоли по массе
УПЖ	–увеличение продолжительности жизни
ЧМ	– частота метастазирования опухоли
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс