

На правах рукописи

ДУДИНА
Марина Олеговна

**АНТИБЛАСТОМНАЯ АКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ
4-АЛКИЛ-ЗАМЕЩЕННОГО ПРОИЗВОДНОГО
АМИНОХРОМЕНА**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология
(медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Блинова Екатерина Валериевна

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент

Шаробаро Владимир Ильич

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук

Абакушина Елена Вячеславовна

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

Доктор медицинских наук, доцент

Корокин Михаил Викторович

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра фармакологии и клинической фармакологии, профессор кафедры

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в __ час. на заседании Диссертационного Совета Д 208.072.01 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1 и на сайте <http://rsmu.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Духанин Александр Сергеевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы

На протяжении последних десятилетий в мире наблюдается неуклонный рост заболеваемости онкологическими новообразованиями [Teixeira S.F. et al., 2013]. Рак легких среди всего спектра злокачественных опухолей обладает одним из самых неблагоприятных прогнозов как для выздоровления, так и для жизни пациентов. При этом рак легких занимает первое место в структуре онкологической смертности у мужчин и второе место – у женщин во всем мире [Mendes F., Hespanhol V., 2015], в том числе и в Российской Федерации.

Рак легкого формируется в результате онкогенной альтерации ткани – эпителия респираторного тракта, в частности, бронхов, бронхиол и альвеол [Longo D.L., 2014]. Множественные морфологические, молекулярные и генетические изменения влекут за собой аккумуляцию злокачественных клеток [Andrews T.D., 2012; Davidson M.R., 2014].

Немелкоклеточный рак легкого наиболее часто встречающаяся форма, составляющая не менее 80% от всех злокачественных процессов легких, при этом аденокарцинома занимает лидирующие позиции (40% всех случаев онкологического поражения органа). Выбор методов лечения определяется совокупностью следующих факторов, относящихся как к пациенту, так и к опухоли: гистологическая форма рака, стадия развития опухоли, молекулярно-биологическая характеристика опухолевых клеток, общее состояние пациента и коморбидность [Mollberg N., 2013; Fortunato O., 2014]. При этом в спектре возможных воздействий клиницисты могут выбирать хирургические, лучевые, химиотерапевтические методы или их комбинации [Hammerschmidt S., 2009]. Несмотря на то, что химиотерапевтические методы лечения чрезвычайно широко используются в онкологии, фармакологическое лечение рака легкого имеет ряд сдерживающих факторов, ведущим среди которых является трудность создания высоких действующих концентраций препарата в легочной ткани, даже введенных в высоких дозах [Long J., 2014].

В последние годы в связи с успехами в области молекулярной биологии, генетике, иммунологии были вскрыты разнообразные молекулярные изменения – мутации и генные трансформации, отвечающие за процесс развития опухолевой ткани, и, следовательно, определяющих прогноз заболевания [Tovar I., 2014]. Фармакотерапевтические подходы, базирующиеся на определенных молекулярных механизмах развития опухоли, называются направленной, таргетной или персонализированной терапией.

Подобные химиотерапевтические протоколы воздействуют на конкретные биологические мишени и существенно повышают

продолжительность жизни, особенно у пациентов, которым не показано хирургическое лечение [Parente Lamelas I., 2012; Chung T.W., 2014]. Химиотерапия, воздействующая на биомишени, может быть использована для идентификации рисков в зависимости от генетической характеристики, а также позволяет воздействовать на опухоль прицельно в определенное время и в строго определенной дозе и / или концентрации [Sklodkowska J., 2016].

Степень разработанности проблемы

Основополагающие данные о противоопухолевой активности замещенных 2-амино-3-цианохроменов опубликованы в последнее время [Seve P., 2015, Blinova E. et al., 2018]. Так, было показано, что 6-арил-2-амино-3-цианохромены являются активаторами апоптоза, а так же ингибиторами полимеризации тубулина. При этом было установлено, что наиболее активными являются соединения, содержащие донорные заместители как в арильном цикле, так и в положениях 6-, 7- или 8-хроеновой системы. В более поздних работах изучались 2-аминохромены, содержащие отличные от базовых систем заместители или более сложные соединения. Так в работах [Дудина М.О. и соавт., 2019; Semenova M.N. et al., 2015; Blinova E. et al., 2018] изучалась противоопухолевая активность хроменов, содержащих в арильном цикле акцепторные заместители, такие как атомы фтора, хлора, брома, нитрогруппа и другие. При этом их активность оказалась существенно ниже донорных аналогов.

Определенный интерес представляют 2-аминохромены, содержащие гетероцикл вместо арильного заместителя [Afifi Tarek H. et al., 2017] или сложноэфирную группу вместо нитрильной [Akbarzadeh A., 2012], однако биологическая активность таких соединений изучена достаточно поверхностно, что обуславливает высокую актуальность настоящей работы.

Цель работы

На основе комплексного экспериментального исследования токсичности, противобластомной активности и безопасности обосновать перспективность использования 4-алкил-замещенного производного аминохромена АХ-554 как источника создания химиотерапевтического лекарственного средства.

Задачи исследования

1. Изучить острую токсичность 4-алкил-замещенного производного 2-аминохромена при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении и влияние субтоксических доз вещества АХ-554 при курсовом внутрижелудочном введении на некоторые показатели гомеостаза лабораторных животных.

2. Определить диапазон эффективных противоопухолевых доз и

концентраций вещества АХ-554 в эксперименте на сингенной опухоли легкого у мышей и в культуре клеток немелкоклеточного рака легкого А549/АТСС.

3. Исследовать противоопухолевую активность и антиметастатическое действие 4-алкил-замещенного производного 2-аминохромена АХ-554 при курсовом внутрижелудочном введении в эффективных терапевтических дозах на модели карциномы легкого Lewis.

4. Изучить аллергизирующие и иммунотоксические свойства 4-алкил-замещенного производного 2-аминохромена АХ-554 при курсовом внутрижелудочном введении.

5. Исследовать мутагенную безопасность АХ-554, канцерогенность 4-алкил-замещенного производного 2-аминохромена, а также влияние курсового внутрижелудочного введения вещества на репродуктивную сферу животных и состояние потомства.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное экспериментальное исследование безопасности и противоопухолевой активности 4-алкил-замещенного производного 2-аминохромена АХ-554 в виде фармацевтической субстанции в отношении солидной опухоли легкого и в культуре клеток немелкоклеточного рака легкого. При изучении острой токсичности вещества АХ-554 в виде фармацевтической субстанции для мышей и крыс обоего пола впервые показано, что степень интоксикации, вызванной введением вещества, носит дозозависимый характер. Основными признаками интоксикации являются выраженное угнетение двигательной активности, миорелаксация, затруднение дыхания. АХ-554 относится к 4 классу опасности (малоопасные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76. В соответствии с модифицированной классификацией Организации экономического содействия и развития (ОЕСД) фармацевтическая субстанция АХ-554 относится к VI классу токсичности (относительно безвредные вещества) при введении внутрижелудочно мышам и крысам и при введении внутрибрюшинно мышам. При внутрибрюшинном введении крысам вещество относится к V классу токсичности (практически нетоксично). Впервые показано, что АХ-554 при однократном внутрижелудочном введении в средне-терапевтической, 5- и 10-кратной средне-терапевтической дозах, вызывает снижение амплитуды зубца Т на ЭКГ крыс, снижение протромбинового индекса относительно параллельного контроля, не изменяет поведения животных и артериального давления.

Впервые установлено, что в диапазоне доз от 21,2 до 384,0 мг/кг и концентраций от 10^{-9} до 10^{-4} М АХ-554 подавляет соответственно рост опухоли в модельной системе у мышей и вызывает гибель злокачественных клеток немелкоклеточного рака легкого А549/АТСС в опытах *in vitro* от 20% до 90%.

Высшая терапевтическая доза АХ-554 превышает минимально действующую более, чем в 18 раз, что свидетельствует о большой широте терапевтического действия вещества.

Установлено, что внутрижелудочное курсовое введение фармацевтической субстанции АХ-554 увеличивает продолжительность жизни животных – носителей карциномы легкого Lewis, причем в группе мышей, получавших средне-терапевтическую дозу АХ-554, средняя продолжительность жизни составляет 53 дня, а у животных, получавших в течение 7 суток внутрижелудочно высшую терапевтическую дозу субстанции, – 58 суток, что в последнем случае превышает продолжительность жизни мышей контрольной группы более, чем на 50%.

Впервые установлено, что при однократном и курсовом внутрижелудочном введении АХ-554 в терапевтических и субтоксических дозах вещество не проявляет аллергенных, иммунотоксических, канцерогенных и мутагенных свойств. Изученное 4-алкил-замещенное производное 2-аминохромена не оказывает негативного влияния на репродуктивную функцию самцов и самок крыс и не обладает эмбриотоксическим действием.

Научно-практическая значимость работы

Получены новые данные о биологической природе и совокупности фармакологических эффектов представителей перспективного класса веществ, обладающих противоопухолевой активностью, – 4-алкил-замещенных производных 2-аминохромена, обогащающие современную науку и практику.

Комплекс научных результатов о токсикологической характеристике соединения АХ-554 в виде фармацевтической субстанции, его химиотерапевтической активности, отсутствии аллергизирующего, иммунотоксического, мутагенного, канцерогенного и эмбриотоксического эффектов, наряду со сведениями, обобщающими характер влияния АХ-554 на репродуктивную сферу животных при курсовом внутрижелудочном введении вещества в терапевтических и субтоксических дозах, позволяют рассматривать исследуемое производное 2-аминохромена в качестве потенциального противоопухолевого лекарственного средства для химиотерапии немелкоклеточного рака легкого, обосновывают необходимость проведения изучения спектра терапевтической активности, механизма действия, фармакокинетики и биодоступности при внутрижелудочном введении.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено в полном соответствии с положениями «Руководства по доклиническому изучению лекарственных средств» и включало постановку опытов *in vivo* и *in vitro*.

Острая токсичность производного аминохромена АХ-554 изучена на двух

видах грызунов – мышах и крысах обоего пола – при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении с проведением контроля массы тела, поведенческих реакций, общего вида животных. Расчет показателей токсичности проведен с использованием пробит-анализа методом Finney.

Влияние длительного курсового внутрижелудочного введения АХ-554 на экспериментальную летальность и показатели гомеостаза лабораторных грызунов проведено в хроническом опыте на крысах с неинвазивной регистрацией АД, ЭКГ, поведенческих реакций, показателей коагулограммы.

Противоопухолевая активность АХ-554 изучена на модели сингенной гетеротопической солидной опухоли Lewis, дающей метастазы в легкие, перевитой на мышей-самцов С₅₇В1/6, а также на культуре немелкоклеточного рака легкого А549/АТСС, путем определения эффективных доз и концентраций АХ-554, регистрации размера опухолевого узла в динамике, количества и размеров метастазов в легкие, выживаемости животных – носителей опухолевых систем, частоте выздоровления и ремиссий.

Аллергизирующие и иммунотоксические свойства АХ-554 изучены в опытах *in vivo* и *in vitro* путем постановки реакций анафилаксии, гиперчувствительности немедленного и замедленного типов, специфического лизиса лейкоцитов, НСТ-теста, определения уровня гемагглютининов и гемолизинов.

Мутагенное действие АХ-554 при внутрижелудочном введении было изучено в тесте Эймса с системной метаболической активацией и без таковой на основании сопоставления количества спонтанных и индуцированных ревертантных колоний. В качестве тест-объекта использовали *Salmonella typhimurium* – штаммы ТА 97, ТА 98 и ТА 100. Канцерогенность АХ-554 оценивали по способности вещества индуцировать ДНК-повреждения в паренхиматозных клетках костного мозга, печени, почек и селезенки методом ДНК-комет.

Влияние курсового внутрижелудочного введения терапевтических и субтоксических доз АХ-554 на репродуктивную сферу самцов и самок оценивали на основе анализа фертильности, морфологического исследования половых органов животных, изучения морфофункционального состояния потомства.

Связь диссертации с основными научными темами Сеченовского университета

Настоящий диссертационный проект выполнен в соответствии с комплексным планом научных исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) при частичной финансовой поддержке Государственного контракта от 22 ноября 2017 года №

14.N08.11.084 «Доклинические исследования лекарственного средства, действующего на рецепторные тирозинкиназы ALK (киназа анапластической лимфомы) и Met, Бета-тубулин класс 3 (TUBB3), для лечения рака лёгких» (шифр темы – 2017-14-N08-0070) Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации № 91 от 17 февраля 2011 года.

Ключевые результаты диссертации внедрены в научно-исследовательскую работу кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, учебный процесс и работу научного семинара, используются в исследовательском процессе лаборатории фармакологии и отдела химии, технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля АО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна), лаборатории фармакокинетики и таргетной фармакотерапии Центра перспективных исследований инновационных лекарственных средств ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» (г. Саранск).

Основные положения, выносимые на защиту

1. При изучении острой токсичности при внутрижелудочном введении установлено, что фармацевтическая субстанция АХ-554 относится к 4 классу опасности (малоопасные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76. В соответствии с модифицированной классификацией Организации экономического содействия и развития (ОЕСД) АХ-554 относится к VI классу токсичности (относительно безвредные вещества) при введении внутрижелудочно мышам и крысам и при введении внутрибрюшинно мышам. При введении внутрибрюшинно крысам вещество относится к V классу токсичности (практически нетоксично).

2. Диапазон эффективных цитотоксических концентраций в отношении опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого А549/АТСС находится в пределах от 10^{-9} до 10^{-4} М, при этом средняя эффективная концентрация составляет 2×10^{-7} М, что сопоставимо с вычисленными эффективными дозами фармацевтической субстанции АХ-554 на опухолевой модели *in vivo*: ЭД₂₀ составила 21,2 мг/кг, ЭД₅₀ составила 137,6 мг/кг, в то время как ДД₉₀ равнялась 384,0 мг/кг.

3. На гетеротопической модели сингенной опухоли мышей – карциноме легкого Lewis – курсовое 7 суточное внутрижелудочное введение 4-алкил-замещенного производного 2-аминохромена АХ-554 в средне-терапевтической и высшей терапевтической дозах сопровождалось формированием противоопухолевого и антиметастатического действия в виде торможения роста

опухоли, уменьшения частоты метастазирования и количества метастазов в легкие, а также увеличением продолжительности жизни животных – носителей опухоли.

4. Внутривенное однократное и курсовое введение 4-алкилзамещенное производное 2-аминохромена АХ-554 является безопасным, поскольку не сопровождается развитием аллергических реакций немедленного и замедленного типа, иммунотоксического действия, не повышает вероятность мутагенных aberrаций ДНК, не оказывает отрицательного влияния на фертильную функцию самцов и самок и полученное от них потомство.

Степень достоверности

Работа проводилась в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики. В качестве биологического объекта для экспериментальных исследований использованы лабораторные животные, в том числе линейные, бактериальные тест-системы, а также культуры опухолевых клеток, полученные из сертифицированных питомников, государственных банков штаммов микроорганизмов и опухолей. Содержание, хранение, культивирование и все манипуляции с биологическими объектами выполнялись в строгом соответствии с требованиями национального законодательства и иных регулирующих нормативно-правовых актов. Для регистрации эффектов использованы образцы субстанции АХ-554, прошедшие аналитический контроль, и референтные противоопухолевые лекарственные средства в виде официальных лекарственных форм, приобретенные у официальных дистрибуторов. Репрезентативность полученных итоговых данных подтверждена достаточным количеством животных в составе опытных групп, а также использованием корректных и общепринятых методов сбора, обработки, хранения и статистического анализа информации.

Апробация результатов работы

Апробация результатов диссертации проведена на совместном заседании кафедр оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины; фармацевтической технологии и фармакологии Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол №1 от 04.10.2019 г.

Результаты исследований докладывались на XXVI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2019), конгрессе «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» XIX Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей с международным участием (Санкт-Петербург, 2018), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Алмазовские чтения-2018» (Санкт-Петербург, 2018).

Личный вклад автора

Идея выполнения настоящей работы принадлежит М.О. Дудиной. Автор диссертации самостоятельно сформулировала цели и задачи работы, разработала ее план и дизайн. Автор лично обобщила зарубежный и отечественный литературный материал и написала литературный обзор. Ею были поставлены эксперименты по изучению острой и хронической токсичности АХ-554. Автор лично перевивала опухолевый штамм линейным мышам и работала с культурами клеток. При вовлеченном участии автора проведены опыты по изучении аллергенного и иммунотоксического действия субстанции. Автор деятельно участвовала в исследованиях мутагенности и канцерогенного потенциала АХ-554. Ею лично изучена репродуктивная токсичность производного 2-аминохромена. Сбор, хранение, статистическая обработка первичных данных проведены лично автором работы. Автор непосредственно участвовала в подготовке научных публикаций по материалам исследований.

Публикации по теме диссертационной работы

По теме диссертационного исследования опубликовано 8 научных работ, из них: 3 статьи – в журналах, входящих в перечень ВАК при Минобрнауки России, из которых 1 статья – в журнале, индексируемом международной системой цитирования Scopus; а также 1 патент на изобретение Российской Федерации.

Объём и структура работы

Диссертация написана в соответствии с требованиями к рукописям диссертационных работ, включает введение, обзор литературы, главу с описанием материалов и методов исследования, использованных в работе. Раздел собственных результатов изложен в четырех главах. В заключении отражены перспективы дальнейшего развития темы, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Диссертация изложена на 143 страницах компьютерного текста, иллюстрирована двадцатью рисунками и тридцатью пятью таблицами. Библиографический список содержит выходные данные 140 работ, из которых 15 работ отечественных и 125 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Настоящее диссертационное исследование выполнено в соответствии с требованиями приказа Минздрава России №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», иными нормативными правовыми актами, регламентирующими доклинические

лабораторные исследования, основываясь на принципах гуманного обращения с подопытными животными. Протоколы лабораторных экспериментов прошли этическую экспертизу на заседании Комиссии по биоэтике ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. ИМ. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол №05-19 от 10 апреля 2019 года.

Лабораторные животные и соблюдение требований к их содержанию

Работа выполнена на 81 самцах и 81 самках белых беспородных мышей весом 18-22 г, 128 самцах и 188 самках белых беспородных крыс весом 180-240 г, 126 морских свинок-самцах Агути весом 280-350 г, полученных в питомнике «Андреевка» ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России; 295 самцах и 35 самках инбредных мышей линии C₅₇Bl/6, полученных в питомнике SPF-животных ФГБУ «Институт биоорганической химии им. академиков Шемякина и Овчинникова РАН» (г. Пущино). Содержание животных и все манипуляции с ними проводились в строгом соответствии действующими ГОСТами и Директивой Совета Европы по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Для выполнения исследования и получения репрезентативных результатов формировали группы из 6, 10 или 20 особей. Большие группы, включавшие по 10 или 20 голов, формировались в том случае, когда в процессе выполнения эксперимента требовалась сепарация животных или тогда, когда опыт предусматривал высокую экспериментальную убыль лабораторных животных (при проведении острого токсикологического эксперимента). Все болезненные процедуры, а также эвтаназия проводилась в условиях обезболивания. Для эвтаназии использовался эфирный наркоз.

Фармакологическая характеристика исследуемых веществ и препаратов сравнения. Обоснование доз, путей и режимов введения

В работе изучено соединение 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаной (лабораторный шифр АХ-554), синтезированное в отделе химии, технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля АО «ВНЦ БАВ» в виде фармацевтической субстанции, представляющей собой мелкокристаллический порошок желтого цвета без запаха, плохо растворимый в воде.

В зависимости от решаемых задач в качестве препаратов сравнения использовали представители блокаторов синтеза опухолевой ДНК из группы препаратов платины цисплатин («Цисплатин-ЛЭНС» производства «VeroPharm») и противоопухолевый антибиотик доксорубицин («Доксорубицин-Тева» производства Фармахеми Б.В., Нидерланды), с

доказанной эффективностью в отношении немелкоклеточного рака легкого. При выполнении токсикологического раздела исследования в качестве референтного противоопухолевого препарата, обладающего выраженным отрицательным цитогенетическим эффектом и хорошей биодоступностью при внутрижелудочном введении, использовали циклофосфамид («Эндоксан» производства «Бакстер Онкология ГмбХ», Германия). Исследуемое соединение и референтный препарат циклофосфамид вводили животным внутрижелудочно в 2% крахмальном геле в объеме, не превышающем для мышей 1 мл, крыс – 3 мл и морских свинок – 5 мл.

Дозы для исследования противоопухолевой активности в опытах *in vivo* и *in vitro* рассчитывали, исходя из значений показателей ЛД₁₀, ЛД₅₀ и ЛД₉₀ для мышей и крыс при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении соответственно. Для изучения аллергизирующего, иммунотоксического, мутагенного, канцерогенного действия и влияния АХ-554 на репродуктивную систему животных использовали минимально-действующую (МДД), средне-терапевтическую (СТД) и высшую терапевтическую (ВТД) дозы, определенные на этапе изучения антибластомной активности вещества с применением коэффициентов биологического переноса дозы для крысы и морской свинки.

Дозы цисплатина и доксорубицина определялись с использованием коэффициента переноса дозы со средне-терапевтической однократной (или суточной) дозы человека, указанной фирмой-производителем препарата в инструкции по медицинскому применению.

Методы исследования

Определение острой токсичности АХ-554 при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении нелинейным мышам и крысам обоего пола проводили с помощью пробит-анализа методом Finney. Определение диапазона терапевтических доз было проведено на модели карциномы легкого Lewis (LLC) на линейных мышах-самцах C₅₇Bl/6 весом 18-20 г в соответствии с актуальными методическими указаниями. Исследование эффективных концентраций АХ-554 было определено в культуре клеток немелкоклеточного рака легких А549/АТСС при их инкубировании в среде с добавлением АХ-554 в не менее, чем семи концентрациях: 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ М. Противоопухолевая активность АХ-554 оценивалась в сингенной опухолевой системе – карциноме легкого Льюис (LLC) на линейных мышах-самцах C₅₇Bl/6 весом 18-20 г, которым подкожно перевивалась взвесь опухолевых клеток LLC в область бедра задней лапки слева в количестве 1×10⁶ клеток в растворе Хенкса (ООО «Биолот», Россия)

Изучение безопасности перспективного отечественного производного 2-аминохромена включало комплексное исследование его аллергизирующей активности, иммунотоксичности, канцерогенности, мутагенности и репродуктивной токсичности.

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили методами вариационной статистики с использованием пакета программ «BioStat» (Россия). При анализе различий в абсолютном размере изучаемого явления использовали непараметрические критерии (в зависимости от объема групп применяли точный критерий Фишера или критерий «Хи-квадрат»). При анализе различий средних или относительных величин, вычисленных при регистрации измеряемых параметров, использовали параметрические критерии сравнения 3 и более совокупностей (Ньюмена-Кейлса, Тьюки) после проверки нормальности распределения с помощью одномерного дисперсионного анализа (ANOVA). Также применяли функциональные возможности U-критерия Манну-Уитни для независимых выборок. При анализе динамики летальности мышей в опытах с экспериментальным канцерогенезом, строили кривую выживаемости, прогноз продолжительности жизни осуществляли при помощи критерия Гехана с поправкой Йейтса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе определили токсикологический профиль производного 4-алкил-замещенного производного аминохромена АХ-554 при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении нелинейным мышам и крысам обоего пола. Согласно результатам эксперимента и данным пробит-анализа ЛД₅₀ соединения АХ-554 в виде фармацевтической субстанции для самцов и самок крыс при внутрижелудочном введении составляет более 5000 мг/кг; при внутрибрюшинном введении для самцов показатель составляет 1222,6±28,4 мг/кг; для самок – 850,8±29,4 мг/кг. При внутрибрюшинном введении вещества АХ-554 в виде фармацевтической субстанции самкам и самцам крыс в дозах 500 мг/кг, 1000 мг/кг и 2000 мг/кг отмечали отставание прироста массы тела на протяжении всего периода наблюдения у всех подопытных животных (Табл.1).

При выполнении исследования мы установили, что внутрижелудочное введение фармацевтической субстанции АХ-554 самцам во всех исследованных дозах вызывает изменение зубца Т на электрокардиограмме, снижая его амплитуду относительно параллельного контроля (в среднем в ТД – на 33%, в 5-ТД – на 34% и в 10-ТД – на 25%). У самок крыс внутрижелудочное однократное введение субстанции АХ-554 в указанном диапазоне доз не

оказывает влияния на параметры ЭКГ. Анализ поведения крыс в «Открытом поле» показал, что однократное внутрижелудочное введение АХ-554 во всех исследованных дозах как в группах самцов так и самок не оказывает негативного влияния на поведение экспериментальных животных: не наблюдали увеличения уровня тревожности (груминг, дефекации), угнетения двигательной (пересечение сектора, общее число локомоций) и познавательной активности (норковый рефлекс, стойки).

Таблица 1 – Интегральные показатели острой токсичности самцов и самок крыс при введении вещества АХ-554 в виде фармацевтической субстанции

Параметры острой токсичности	Самцы		Самки	
	Внутрижелудочное введение	Внутрибрюшинное введение	Внутрижелудочное введение	Внутрибрюшинное введение
ЛД ₁₀₀ , мг/кг	-	2266,7	-	1615,5
ЛД ₈₄ , мг/кг	-	1918,7	-	1360,6
ЛД ₁₆ , мг/кг	-	626,5	-	340,9
ЛД ₁₀ , мг/кг	-	330,4	-	197,3
ЛД ₅₀ , мг/кг (M±m)	>5000	1222,6±28,4	>5000	850,8±29,4

На следующем этапе исследования была изучена противоопухолевая активность соединения АХ-554. Были рассчитаны эффективные противоопухолевые дозы и концентрации вещества. Для определения диапазона эффективных противоопухолевых доз вещества были использованы дозы, составляющие 0,25%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, 7,5% и 10% от показателя ЛД₅₀, определенного при внутрижелудочном введении мышам, а также сингенная опухолевая модель – карцинома легкого Lewis. ЭД₂₀ АХ-554 составила 21,2 мг/кг, ЭД₅₀ составила 137,6 мг/кг, в то время как ЭД₉₀ равнялась 384,0 мг/кг (рис. 1).

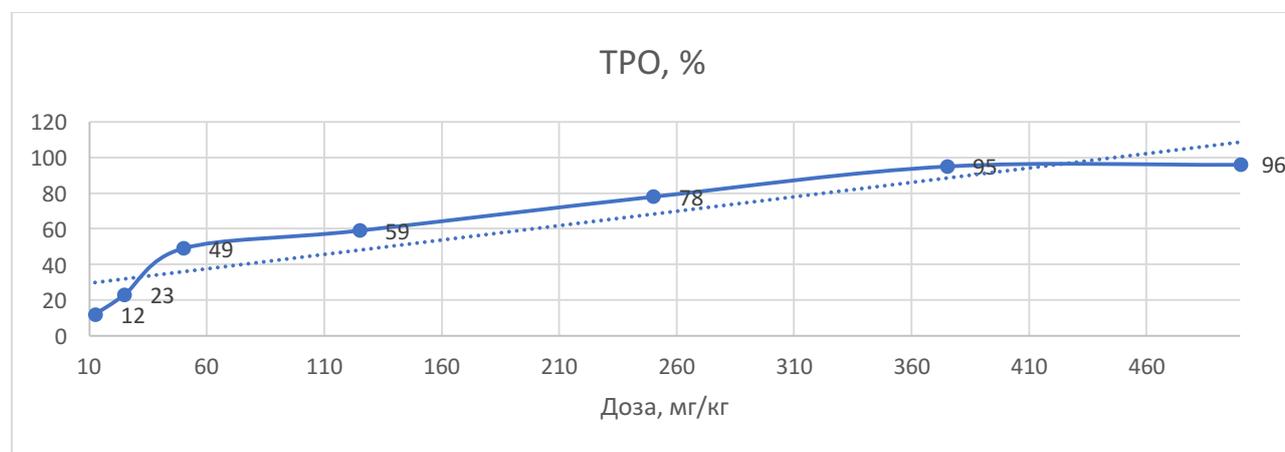


Рисунок 1 – Кривая «доза – эффект» (по значению индекса ТРО) на 7 сутки после завершения внутрижелудочного введения АХ-554 в диапазоне доз от 0,25 до 10% от ЛД₅₀ мышам-самцам C₅₇Bl/6 с LLC

При расчете терапевтических индексов (ТИ₂₀, ТИ₅₀ или ТИ₉₀ как соотношение соответствующей летальной и эффективной доз) нами были получены следующие показатели: 94,3; 36,3 и 23,4 соответственно. Следовательно, для дальнейшего доклинического исследования специфической противоопухолевой активности и механизмов антибластомного действия вещества АХ-554 можно рекомендовать следующие дозы: МДД – 21,2 мг/кг, STD – 137,6 мг/кг и ВТД – 384,0 мг/кг. Поскольку доза 384 мг/кг соответствует 7,68% от показателя ЛД₅₀, определенного для данного пути введения у мышей, она соответствует условиям, согласно которым ВТД не должна превышать 10% от показателя ЛД₅₀.

Исследование эффективных концентраций АХ-554 определено в культуре клеток немелкоклеточного рака легкого при их инкубировании в среде с добавлением АХ-554 в семи концентрациях: 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ М. По результатам культуральных исследований на основе анализа концентрации ЛДГ в среде культивирования были вычислены показатели ЭК₂₀, ЭК₅₀ и ЭК₉₀ – расчетные концентрации, вызывающие гибель 20%, 50% и 90% клеточной популяции в культуре соответственно, и составившие соответственно 10⁻⁹, 2x10⁻⁷ и 10⁻⁴ М. Таким образом, диапазон эффективных цитотоксических концентраций в отношении опухолевых клеток немелкоклеточного рака легкого находится в пределах от 10⁻⁹ до 10⁻⁴ М, при этом средняя эффективная концентрация составляет 2x10⁻⁷ М, что сопоставимо с концентрациями фармацевтической субстанции в плазме крови и легочной ткани при её внутрижелудочном введении нелинейным мышам в ЭД₂₀, ЭД₅₀ и ЭД₉₀ и внутривенном введении в ЕД₅₀ в рамках проведения фармакокинетических исследований фармацевтической субстанции (рис. 2).

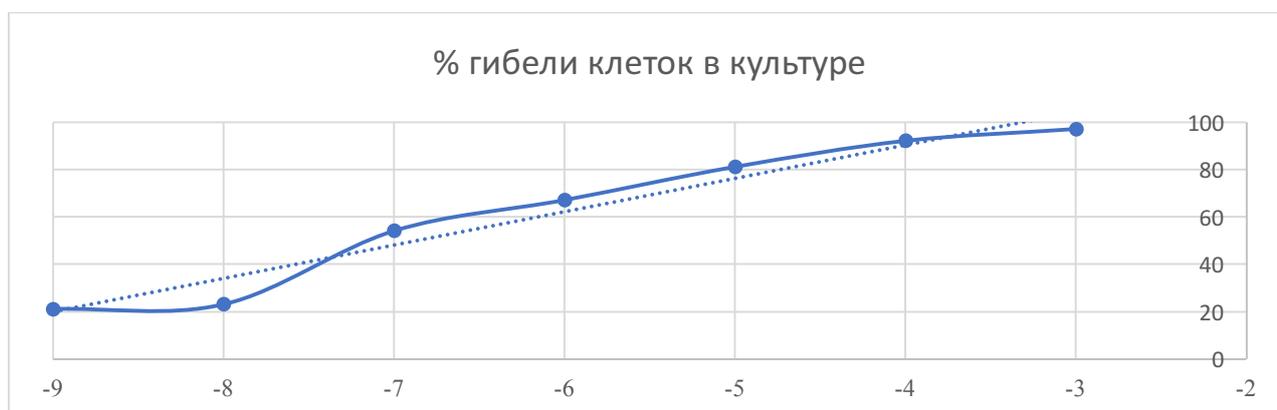


Рисунок 2 – Кривая «концентрация – эффект» (по значению % гибели клеток культуры LLC) при ее 24-часовом инкубировании с фармацевтической субстанцией АХ-554 в диапазоне концентраций от 10⁻⁹ до 10⁻³ М (по оси абсцисс – степень концентрации в М)

На третьем этапе исследования оценивали противоопухолевую активность в отношении сингенной гетеротопической опухолевой системы – карциномы легкого Lewis – по ингибированию роста опухоли при внутрижелудочном введении АХ-554 и препаратов сравнения в трех дозах – минимально-действующей, средне-терапевтической и высшей терапевтической. В контрольной группе животных подкожная сингенная опухоль достигала на 1 сутки после отмены внутрижелудочного введения физиологического 0,9% раствора хлорида натрия в среднем 932 мм^3 , на 7 сутки – 4142 мм^3 , а на 21 сутки наблюдения – 8887 мм^3 .

Вес солидной опухоли, полученной у выведенных из эксперимента животных на 22 сутки после прекращения введения плацебо, равнялся $9,3 \pm 0,6 \text{ г}$. При изучении препарата сравнения доксорубицина лишь в высшей терапевтической дозе, составившей $166,4 \text{ мг/кг/сутки}$, у препарата сохранялся эффект по подавлению роста сингенного рака легкого мыши более, чем на 50% на 7 сутки наблюдения и, таким образом, препарат сравнения оказывал умеренное антибластомное действие на исследуемой опухолевой системе. Однако, следует подчеркнуть, что противоопухолевое действие препарата усиливалось к 14 суткам после его отмены, поскольку наблюдали повышение индекса ТРО по сравнению с предыдущими значениями, рассчитанными для препарата. В том числе, индекс превышал значение 50% как в серии животных, получавших ВТД препарата, так и СТД доксорубицина.

Второй препарат сравнения цисплатин оказывал высокий противоопухолевый эффект в СТД и ВТД и умеренное противобластомное действие в МДД: его действие продолжалось во времени, о чем свидетельствовало продолжающееся сокращение роста опухоли и уменьшение ее размеров при сравнении с размерами, вычисленными на предыдущих точках измерения, что нашло свое отражение и в значении индекса ТРО. Препарат обладал также мощным антиметастатическим действием: в высшей терапевтической дозе частота метастазирования в серии составила лишь 30%.

АХ-554 при внутрижелудочном введении в трех исследуемых дозах также продемонстрировало наличие высокого противоопухолевого эффекта на сингенной опухолевой модели (рис. 3). При введении в течение 7 суток в минимально-действующей дозе $21,2 \text{ мг/кг}$ индекс ТРО на 7 сутки после прекращения лечения – наиболее чувствительный индикатор эффективности – составлял 37%. Однако при увеличении дозы до средней терапевтической – $137,6 \text{ мг/кг/сутки}$ значение индекса к 7 суткам составляло 68, а высшей терапевтической дозе – 74. Также для вещества АХ-554 присуща закономерность, описанная для цисплатина, а именно сохраняющийся после отмены цитостатический эффект, проявляющийся в углублении

противоопухолевой активности, и прогрессирующего уменьшения массы и объема опухоли.

Производное 2-аминохромена в средней и высшей терапевтических дозах оказывало заметное антиметастатическое действие в виде снижения частоты метастазирования и среднего числа поверхностных метастазов. При исследовании выживаемости животных все исследуемые референтные противоопухолевые ЛС увеличивали продолжительность жизни экспериментальных мышей с сингенной опухолью (рис. 3). При этом наибольшая средняя продолжительность жизни отмечена в группе животных, получавших ВТД доксорубицина – 63 дней и ВТД цисплатина – 61 день. Вещество АХ-554 также увеличивало продолжительность жизни животных, причем в группе мышей, получавших СТД производного средняя продолжительность жизни составила 53 дня, а у животных, получавших в течение 7 суток внутрижелудочно ВТД субстанции – 58 суток, что в последнем случае превышает продолжительность жизни мышей контрольной группы более, чем на 50%. При изучении частоты ремиссий и выздоровлений при использовании 4-алкил-замещенного производного 2-аминохромена, во всех изученных дозах, ремиссии опухоли и выздоровлений животных не наблюдали.

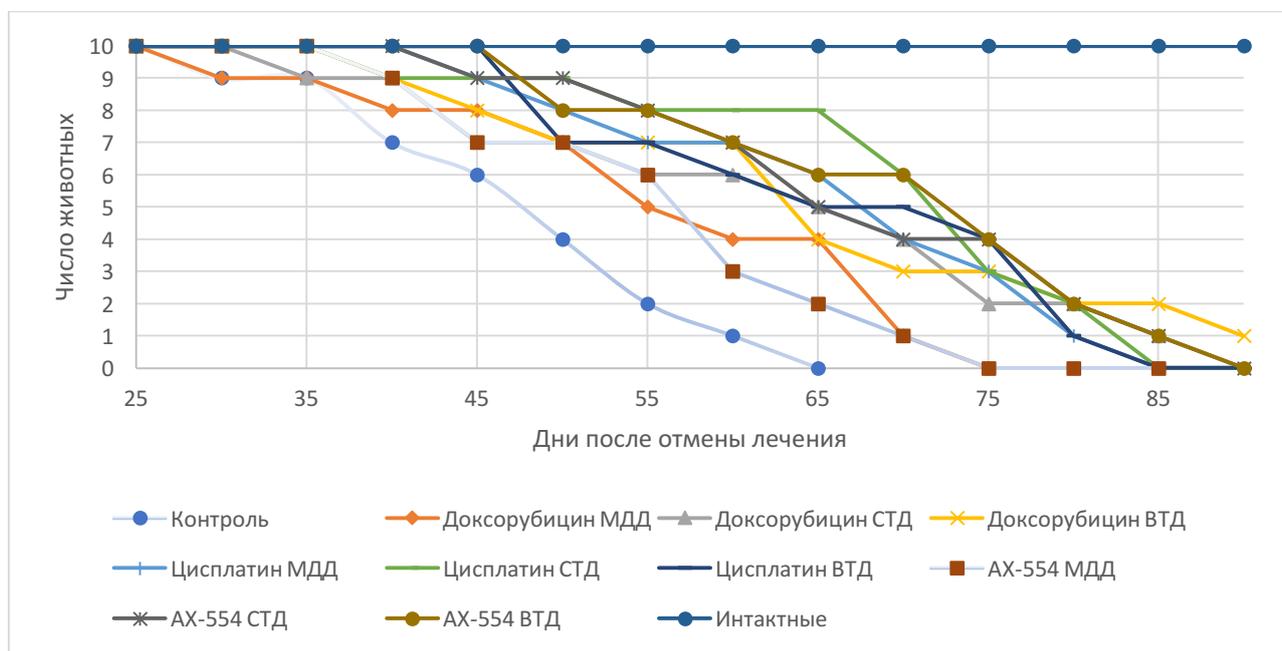


Рисунок 3 – Кривая выживаемости животных через 21 день после отмены специфической противоопухолевой терапии мышам с сингенной опухолью – карциномой легкого Lewis

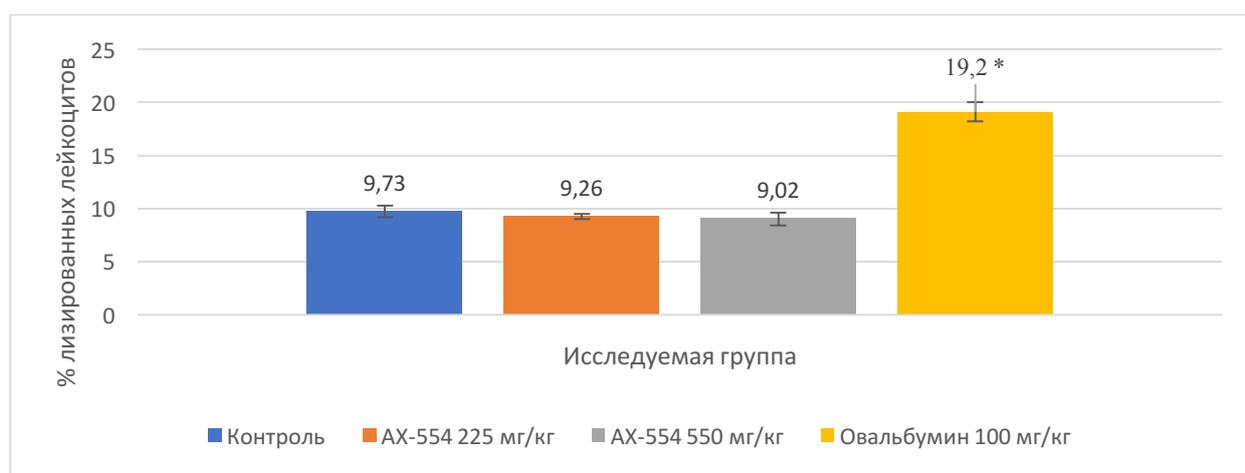
В результате исследования для фармацевтической субстанции АХ-554 установлено наличие двух обязательных критериев из перечня в соответствии с действующими методическими рекомендациями: 1) торможение роста солидных опухолей или подкожно перевитых лейкозов, упомянутых в

обязательном перечне, на 70% и более с сохранением значимого эффекта не менее 7 суток; и 2) увеличение продолжительности жизни животных с солидной опухолью на 50% и более (установлено для всех исследованных солидных опухолей в при внутрижелудочном введении в ВТД).

Для продолжения доклинических исследований оптимальным путем введения является внутрижелудочный, схемой введения – 7 суток.

Изучение безопасности перспективного отечественного производного 2-аминохромена включало комплексное исследование его аллергизирующей активности, иммунотоксичности, канцерогенности, мутагенности и репродуктивной токсичности.

При изучении аллергизирующего действия АХ-554 на модели системной и кожной анафилаксии лекарственное вещество из группы 4-алкил-замещенных производных аминохромена АХ-554 не оказало анафилактогенного действия. На модели реакции гиперчувствительности немедленного и замедленного типа при эпикутанном и конъюнктивальном нанесении вещества АХ-554 морским свинкам оно не оказало сенсibiliзирующего действия. Также оно не оказало сенсibiliзирующего действия на модели ГЗТ у мышей. Определение количества эозинофилов, процента лизированных лейкоцитов и степени фагоцитарной активности нейтрофилов крови у морских свинок, сенсibiliзированных 10-дневным внутрижелудочным введением лекарственного средства АХ-554 (225 мг/кг и 550 мг/кг, соответствующих 5- и 10-кратной СТД), показало отсутствие влияния соединения на данные показатели (рис. 4). Суммируя полученные данные, можно заключить, что АХ-554 в терапевтических дозах не обладает аллергенной активностью.



Примечание: * - различия достоверны по сравнению с группой контроля при $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни)

Рисунок 4 – Реакция специфического лизиса лейкоцитов в крови у самцов морских свинок через 12 суток после сенсibiliзации ($M \pm m$, $n=10$ в каждой группе)

Однократное внутрижелудочное введение АХ-554 мышам в дозах в 5 и 10 раз превышающих СТД для данного вида животных не влияло на формирование гемагглютининов и гемолизинов у мышей. Курсовое внутрижелудочное введение (в течение 21 дня) вещества мышам также не влияло на синтез антител, не оказывало действия на реакцию гиперчувствительности замедленного типа и не изменяло фагоцитарной активности нейтрофилов, выделенных из крови. Следовательно, АХ-554 не оказывает иммунотоксического действия.

Однократное и 5-ти кратное внутрижелудочное введение АХ-554 инбредным мышам в средне-терапевтической дозе 137,6 мг/кг, а также однократное внутрижелудочное введение в 10-кратной СТД, составившей 137,6 мг/кг (максимальная доза в соответствии с Методическими рекомендациями) не индуцировало хромосомные aberrации в клетках костного мозга животных.

Проведенное исследование позволило установить, что исследуемое соединение 2-аминохромена не индуцирует генные мутации на штаммах *Salmonella typhimurium* ТА 97, ТА 98 и ТА 100 в диапазоне концентраций 0,5 – 5000 мкг/чашка. Полученные данные позволяют заключить, что АХ-554 не оказывает мутагенного действия.

Исследование показало отсутствие достоверных различий между уровнями ДНК-повреждений клеток костного мозга, печени, почки и селезенки через 3 часа после внутрижелудочного введения АХ-554 в дозах 137,6 мг/кг, 688 мг/кг и 1376 мг/кг, составляющих СТД, 5- и 10-кратную СТД по сравнению с контрольной группой животных, получавших растворитель (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние однократного внутрижелудочного введения АХ-554 в СТД, 5- и 10-кратной СТД на уровень ДНК-повреждений в органах и тканях мышей линии С₅₇Вl/6 в условиях 3- и 18-часовой экспозиции (% ДНК в хвосте, М±m, n=5 в каждой группе)

Группа	Клетки печени	Клетки почек	Клетки селезенки	Клетки костного мозга
Через 3 часа после внутрижелудочного введения				
Контроль	4,96±0,96	5,98±1,18	6,41±1,15	5,74±0,86
Циклофосфамид (50 мг/кг)	11,45±1,78*	13,99±1,01*	13,44±2,43*	12,05±1,62*
АХ-554 (137,6 мг/кг)	5,37±0,98	4,91±1,33	6,67±0,34	5,06±0,88
АХ-554 (688 мг/кг)	3,70±0,71	6,27±0,72	6,75±0,62	6,71±0,90
АХ-554 (1376 мг/кг)	4,78±0,70	7,44±1,16	5,16±1,43	5,02±1,05
Через 18 часов после внутрижелудочного введения				
Контроль	4,70±0,82	5,88±0,95	5,65±0,77	4,73±1,02
Циклофосфамид (50 мг/кг)	13,73±2,35*	11,54±1,56*	12,78±2,14*	14,14±1,55*
АХ-554 (137,6 мг/кг)	6,28±0,99	4,94±0,64	6,21±0,62	5,94±0,45
АХ-554 (688 мг/кг)	5,04±0,85	6,20±0,53	5,09±1,12	4,84±1,26
АХ-554 (1376 мг/кг)	5,89±1,05	5,14±1,22	7,18±0,33	4,38±0,85

Примечание: * - различия статистически достоверны по сравнению с контрольной группой при p<0,05 (одномерный дисперсионный анализ, критерий Ньюмена-Кейлса)

Тогда как препарат сравнения циклофосфамид, использованный в качестве позитивного контроля, при внутрибрюшинном введении мышам в дозе 50 мг/кг веса животных, эффективно индуцировал разрывы ДНК в клетках паренхиматозных органов линейных мышей при экспозиции в течение 3 часов.

Показатель индекса фертильности в группах экспериментальных животных, получавших АХ-554, не отличался от показателя в контрольной группе. Все плоды выглядели доношенными, внешних аномалий развития не наблюдалось. Часть самок из каждой группы была оставлена до родов с целью наблюдения за потомством. Наблюдение за развитием потомства в течение 28 дней не выявило существенных различий в общем виде, физическом развитии и поведении. Гибели контрольных и подопытных крысят не происходило. При изучении физического развития потомства не обнаружили статистически значимого отставания в динамике массы тела у крысят, матери которых получали до беременности АХ-554. Такие временные показатели, как сроки отлипания ушных раковин, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов, открытия глаз статистически значимо не отличались от контрольных показателей. Изучение эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном периоде развития показало, что прибавка массы тела беременных крыс в группах, получавших АХ-554 в виде фармацевтической композиции, статистически не отличалась от таковой у животных в контрольной группе. Таким образом, проведенное исследование позволило констатировать, что вещество АХ-554, вводимое внутривенно беременным самкам крыс в дозах 68,8 мг/кг и 688 мг/кг с 5 по 19 дни беременности, не обладает эмбриотоксическим действием, не вызывает постимплантационной гибели, задержки развития плодов, развития анатомических аномалий и патологий костной системы.

Эксперименты по изучению влияния АХ-554 на постнатальное развитие потомства F1 генерации проводили на крысятах, родившихся от самок крыс, получавших АХ-554 с 5 дня беременности до родоразрешения внутривенно в однократной (68,8 мг/кг) и десятикратной (688 мг/кг) СД. В ходе исследования установили, что в опытных группах показатели прибавки массы тела беременных крыс не отличались от контрольных значений. Роды наступали на 20-22 день беременности у всех экспериментальных животных, находящихся под наблюдением. После проведения наблюдения за физическим развитием потомства крыс в течение 21 дня можно заключить, что по всем изучаемым параметрам достоверных различий между экспериментальными и контрольной группами не наблюдалось, Смертности потомства в постнатальном периоде не было. Полученные результаты позволяют сделать вывод об отсутствии явлений репродуктивной токсичности на фоне введения

АХ-554, что согласуется с результатами, полученными ранее для других представителей рассматриваемой группы соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итоги выполненного диссертационного исследования

Таким образом, 4-алкил-замещенное соединение 2-аминохромена АХ-554 относится к 4 классу опасности (малоопасные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 к VI классу токсичности (относительно безвредные вещества) в соответствии с модифицированной классификацией Организации экономического содействия и развития (ОЕСД). В диапазоне доз от 21,2 до 384 мг/кг и концентраций от 10^{-9} до 10^{-4} М АХ-554 подавляет рост опухоли в модельной системе у мышей и вызывает гибель злокачественных клеток немелкоклеточного рака легкого А549/АТСС в опытах *in vitro*. Высшая терапевтическая доза АХ-554 превышает минимально действующую более, чем в 18 раз, что свидетельствует о большой широте терапевтического действия вещества. Внутривенное курсовое введение фармацевтической субстанции АХ-554 увеличивает продолжительность жизни животных – носителей карциномы легкого Lewis, причем у мышей, получавших высшую терапевтическую дозу – до 58 суток, что превышает продолжительность жизни мышей контрольной группы более, чем на 50%. При однократном и курсовом внутривенном введении в терапевтических и субтоксических дозах АХ-554 не проявляет аллергенных, иммунотоксических, канцерогенных и мутагенных свойств. Изученное 4-алкил-замещенное производное 2-аминохромена не оказывает негативного влияния на репродуктивную функцию самцов и самок крыс и не обладает эмбриотоксическим действием.

Практические рекомендации

1. Для дальнейшего доклинического исследования специфической противоопухолевой активности и механизмов антибластомного действия 4-алкил-замещенного производного 2-аминохромена АХ-554 рекомендованы к использованию следующие дозы: МДД – 21,2 мг/кг, СТД – 137,6 мг/кг и ВТД – 384,0 мг/кг. Поскольку доза 384 мг/кг соответствует 7,68% от показателя ЛД₅₀, определенного для данного пути введения у мышей, она соответствует условиям, согласно которым ВТД не должна превышать 10% от показателя ЛД₅₀.

2. Для проведения фармакокинетических исследований и биодоступности АХ-554 рекомендована следующая схема постановки эксперимента: для определения системной кинетики и абсолютной биодоступности – однократное внутривенное введение в трех терапевтических

дозах; для определения биодоступности, тканевого распределения, изучения кумулятивного действия и линейности кинетики при внутрижелудочном введении – в трех терапевтических дозах, а также при трехкратном введении СТД с интервалом 24 часа.

3. Учитывая высокую эффективность АХ-554 при курсовом внутрижелудочном введении и оптимальный профиль безопасности при данном пути введения, при решении вопроса о создании лекарственной формы потенциального лекарственного средства с учетом данных фармакокинетики субстанции рекомендована таблетированная или капсульная форма для приема внутрь.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные результаты изучения токсичности, безопасности и антибластной активности нового оригинального отечественного соединения – 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтаной (лабораторный шифр АХ-554), разработанного синтезированным в отделе химии, технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля АО «ВНЦ БАВ» (Россия), позволяют рассматривать вещество как потенциальное противоопухолевое лекарственное средство для химиотерапии немелкоклеточного рака легкого. В рамках продолжения исследований считаем перспективным изучение молекулярных механизмов противоопухолевого действия вещества, спектра его химиотерапевтической активности в отношении широкой панели опухолевых систем, в том числе на моделях гетеро- и синтопических ксенографтов опухолей человека; разработку оптимальной лекарственной формы АХ-554 и изучение фармакокинетики АХ-554 в виде фармацевтической субстанции и готовой лекарственной формы.

ВЫВОДЫ

1. При внутрижелудочном введении АХ-554 ЛД₅₀ для самцов и самок мышей и крыс составила более 5000 мг/кг. При внутрибрюшинном введении АХ-554 ЛД₅₀ для самцов мышей составила 1567,5±34,6 мг/кг; для самок – 1694,0±28,6 мг/кг; для самцов крыс – 1222,6±28,4 мг/кг, для самок крыс – 850,8±29,4 мг/кг. По параметрам острой токсичности субстанция АХ 554 относится к 4 классу опасности (малоопасные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76.

3. Эффективные противоопухолевые дозы АХ-554, вычисленные на модели солидной гетеротопической опухоли у мышей составили 21,2 мг/кг (МДД), 137,6 мг/кг (СТД) и 384,0 мг/кг (ВТД). Показатели ЭК₂₀, ЭК₅₀ и ЭК₉₀ – расчетные концентрации, вызывающие гибель 20%, 50% и 90% клеточной

популяции немелкоклеточного рака легкого в культуре составляют соответственно 10^{-9} , 2×10^{-7} и 10^{-4} М.

3. При изучении противоопухолевой и антиметастатической активности АХ-554 на модели солидной опухоли установлено, что при внутрижелудочном введении в СТД и ВТД вещество превосходит цисплатин, вводимый в сопоставимых дозах, по показателю торможения роста опухоли на 8-14%; по антиметастатической активности – не уступает цисплатину и доксорубину; увеличивает продолжительность жизни животных более, чем на 50% при сравнении с контролем.

4. Курсовое и однократное введение АХ-554 в терапевтической и субтоксической дозах не вызывает явлений сенсibilизации и иммунотоксичности у животных-акцепторов; в опытах *in vitro* на тестовых системах *Salmonella typhimurium* не повышает частоту хромосомных aberrаций и не повышает процент свободной ДНК в ДНК-кометах клеток костного мозга, печени, селезенки и почек, следовательно, не обладает мутагенным и канцерогенным действием.

5. Внутрижелудочное курсовое (в течение 21 суток) введение АХ-554 в СТД и 10-кратной СТД самкам и самцам крыс не сопровождается нарушением их репродуктивной функции. В указанных дозах вещество не оказывает повреждающего действия на беременную матку крыс-самок и по совокупности морфофункциональных признаков не обладает негативным влиянием на потомство первого поколения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Novel aminochromone derivative inhibits tumor growth on xenograft model of lung cancer in mice / Ekaterina V. Blinova, Marina O. Dudina, Irina R. Suslova, Elena A. Samishina, Dmitry S. Blinov, Dmitry A. Roshchin // **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**. – 2018. – Vol. 9(4). – P. 130-134.
2. Molecular and cellular mechanisms of acute cytotoxic liver damage as potential biological targets for magnesium-containing cell-protective drug / Marina O. Dudina, Irina R. Suslova, Mariya S. Khalzova, Juliya V. Dergunova, Evgeniya A. Kogan, Dmitry A. Roshchin, Elena A. Samyshina, Mikhail A. Morozov, Sergey S. Dydykin // **Research Results in Pharmacology**. – 2018. – Vol. 4(3). – P. 9-15.
3. Патогенетические аспекты антибластомной активности производного аминохромена на модели карциномы легкого / Т.А. Зобнина, А.И. Максимкин, М.О. Краско, М.О. Дудина, И.Р. Суслова // Вестник «Биомедицина и социология». – 2019. – Том. 4(1). – С. 101-112.
4. К вопросу о безопасности 4-алкил-замещенного соединения с противоопухолевым действием / М.О. Дудина, Е.В. Блинова, И.Я. Моисеева, Е.А. Самышина, И.Р. Суслова, Д.С. Блинов // **Кубанский медицинский вестник**. – 2019. – Т. 26, №1. – С. 101-107.

5. К вопросу о противоопухолевой и антиметастатической активности вещества ЛХТ-14-10 / М.О. Дудина, Е.В. Блинова, Д.С. Блинов, А.И. Максимкин // Вестник новых медицинских технологий. – 2019. – Т. 26, №1. – С. 63-66.

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

7. 4-алкил-замещенное производное 2-аминокромена подавляет рост и метастазирование ксенографтной аденокарциномы легкого / Е.А. Самышина, М.О. Дудина, Е.В. Блинова, И.Р. Сусллова, О.Н. Дерябина, Д.С. Блинов, П.Н. Жданов, В.И. Шаробаро // Сеченовский Вестник. – 2019. – Т. 2(2). – С. 15-20.

Патент

8. 2-Аминия-7-(диэтиламино)-4-(4-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-4Н-хромен-3-карбонитрила N-ацетил-аминоэтанойл, проявляющий противоопухолевую активность: пат. №2674987 Рос. Федерация / Скачилова София Яковлевна, Алешина Валентина Алексеевна, Тимохина Ирина Алексеевна, Ермакова Галина Александровна, Гирева Наталия Николаевна, Блинова Екатерина Валериевна, Дудина Марина Олеговна, Ульянова Екатерина Владимировна, Блинов Дмитрий Сергеевич, Коротыночкин Алексей Викторович, заявитель и патентообладатель — Акционерное общество "Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ" АО "ВНЦ БАН", заявл. №2018113993 17.04.2018, опубликовано 14.12.2018. Бюл. №35, 2 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВТД	высшая терапевтическая доза
ГЗТ	гиперчувствительность замедленного типа
ГНТ	гиперчувствительность немедленного типа
КП	коэффициент переноса
ЛД	летальная доза
ЛС	лекарственное средство
МА	метаболическая активация
МДД	минимально-действующая доза
СТД	средне-терапевтическая доза
ТИ	терапевтический индекс
ТРО	торможение роста опухоли
ЭД	эффективная доза
ЭК	эффективная концентрация
LLC	карцинома легкого Lewis