

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
им. Н.Н. Петрова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

на правах рукописи

ПАНЧЕНКО Андрей Владимирович

Новый класс препаратов на основе продуктов гидролизного лигнина: обоснование
применения в качестве средств сопроводительной химио- и лучевой терапии
злокачественных новообразований (экспериментальное исследование)

14.01.12 – онкология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
член-корреспондент РАН,
д.м.н., профессор
Анисимов Владимир Николаевич

Санкт-Петербург, 2019

Оглавление

Введение	6
1. Обзор литературы.....	18
1.1. Побочные эффекты противоопухолевой терапии.....	18
1.2. Химиотерапия и антиоксиданты	24
1.3. Лучевая терапия и антиоксиданты.....	28
1.4. Основные классы полифенольных соединений	31
1.5. Противоопухолевые эффекты полифенольных соединений	33
1.6. Влияние полифенольных соединений на токсичность химиотерапевтических препаратов	37
1.7. Влияние полифенольных соединений на радиационное воздействие	39
1.8. Биологические эффекты полифенольных соединений на основе лигнина	42
2. Материалы и методы исследования.....	47
2.1. Характеристика объектов исследования	47
2.1.1. Полифенольная основа из гидролизного лигнина для композиций ВР-С3, ВР-С2.....	47
2.1.2. Композиция ВР-С3	49
2.1.3. Композиция ВР-С2	50
2.2. Животные	51
2.2.1. Источник и условия содержания.....	51
2.2.2. Этические нормы при проведении опытов с животными	52
2.3. Модели опухолевого роста	52
2.3.1. Параметры оценки	54
2.4. Методы лабораторной диагностики	55
2.4.1. Клинический анализ крови	55
2.4.2. Определение клеточности костного мозга.....	55
2.4.3. Биохимический анализ крови.....	56

2.4.4.	Методы оценки антиоксидантной активности	57
2.5.	Патоморфологические методы исследования.....	59
2.5.1.	Определение органо-весовых коэффициентов	60
2.5.2.	Подсчет количества жизнеспособных крипт кишечного эпителия	60
2.5.3.	Иммуногистохимические исследования	61
2.6.	Радиобиологические методы исследования	62
2.6.1.	Характеристика условий облучения	62
2.6.2.	Показатели продолжительности жизни.....	63
2.6.3.	Оценка объективного статуса экспериментальных животных	63
2.6.4.	Определение содержания колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс) по методу эндогенного колониеобразования	64
2.7.	Статистическая обработка данных.....	65
2.8.	Схемы опытов.....	66
2.8.1.	Исследование <i>in vitro</i> потенциальных молекулярных мишеней действия ВР-Сх-1 в максимально возможной концентрации на панели DiversityProfileP9 (Cerep, Франция)	66
2.8.2.	Моделирование активности полифенольного лиганда ВР- Сх-1 <i>in silico</i>	78
2.8.3.	Исследование фармакокинетики меченного [³ H]-Вр-Сх-1 у мышей BALB/c.....	78
2.8.4.	Исследования эффективности и безопасности ВР-С2 в опытах на грызунах	81
2.8.5.	Исследования эффективности и безопасности ВР-С3 в опытах на мышах	87
2.8.6.	Оценка безопасности длительного применения ВР-С3	94
3.	Результаты исследования	96

3.1. Исследование молекулярных мишеней действия и фармакокинетики полифенольной основы композиций ВР-С2 и ВР-С3	96
3.1.1. Исследование потенциальных молекулярных мишеней действия ВР-Сх-1 <i>in vitro</i> на панели Diversity Profile P9	96
3.1.2. Моделирование активности полифенольного лиганда композиций ВР-С2, ВР-С3 <i>in silico</i>	98
3.1.3. Исследование распределения меченого [³ H]-Вр-Сх-1 у мышей BALB/с.....	99
3.1.4. Исследование фармакокинетики ВР-С2 при многократном введении у крыс, оценка накопления молибдена в органах и кумулятивной токсичности ВР-С2	103
3.2. Экспериментальные исследования радиозащитной эффективности композиции полифенольного производного лигнина с молибдатом аммония – ВР-С2 – у крыс и мышей.....	109
3.2.1. Оценка противолучевых свойств композиции ВР-С2 на крысах-самцах линии Вистар при общем равномерном облучении	109
3.2.2. Определение механизма радиопротекторного действия композиции ВР-С2 на модели острой лучевой болезни у мышей	114
3.2.3. Оценка влияния композиции ВР-С2 на противоопухолевое действие радиотерапии.....	124
3.3. Исследования эффективности полифенольной композиции ВР-С3 в опытах на мышах.....	136
3.3.1. Определение эффективной дозы ВР-С3 на моделях миелодепрессий, вызванных циклофосфамидом и 5-фторурацилом у мышей	136

3.3.2.	Исследование влияния режима введения композиции ВР-С3 на модели 5-ФУ индуцированной миелосупрессии при введении по лечебной и лечебно-профилактической схеме	146
3.3.1.	Определение антиоксидантной емкости ВР-С3 и ВР-С2 и антиоксидантной активности ВР-С3 у мышей BALB/c при введении 5-ФУ	158
3.3.2.	Изучение воздействия ВР-С3 на эффективность химиотерапевтического лечения на модели сарком мягких тканей, индуцированных бенз(а)пиреном у мышей.....	162
3.3.3.	Изучение воздействия ВР-С3 на эффективность химиотерапевтического лечения на модели спонтанных опухолей молочной железы у мышей самок линии FVB, трансгенных по HER-2/neu	178
3.4.	Оценка безопасности длительного применения композиции ВР-С3	188
4.	Заключение и обсуждение	197
4.1.	Потенциальные терапевтические эффекты при применении композиции ВР-С3 в качестве средства сопровождения при химиотерапии	197
4.2.	Потенциальные терапевтические эффекты при применении композиции ВР-С2 в качестве средства сопровождения при лучевой терапии	208
4.3.	Безопасность длительного применения ВР-С3 и ВР-С2	218
	Выводы	222
	Практические рекомендации.....	224
	Перспективы разработки данной темы.....	225
	Сокращения и условные обозначения	227
	Список литературы.....	229

Введение

Актуальность темы

В основе современных подходов к химио- и лучевой терапии больных злокачественными новообразованиями к ведущим принципам противоопухолевой активности относят подавление пролиферации и способности к метастазированию клеток опухоли. При этом практически все химиотерапевтические препараты, виды и режимы лучевого лечения оказывают повреждающее токсическое воздействие на нормальные ткани [351], что существенно влияет на качество жизни пациентов. Как правило, в схемах лечения онкологических пациентов лечебная доза как химиотерапевтического, так и лучевого воздействия, весьма близка к максимально переносимой, что сопровождается развитием нежелательных явлений в 50-90% случаев [23, 24, 39, 41].

Поэтому конечной целью вспомогательного лечения у таких пациентов является снижение токсичности химиотерапии для здоровых тканей, так как побочные эффекты приводят к увеличению интервалов между циклами химиотерапии или требуют снижения дозы, что ухудшает результаты лечения [102]. Варианты лечения таких расстройств остаются ограниченными [282, 358]. В идеале лекарства, используемые для устранения токсических эффектов, не должны иметь побочных эффектов сами по себе, особенно при длительном применении, а также не должны уменьшать эффективность лечения. В этом плане одними из многообещающих являются полифенолы растений. Они защищают здоровые ткани, в частности, уменьшают продукцию внутриклеточных активных форм кислорода, но не эффект химиотерапии [119]. Антиоксидантные свойства хорошо описаны для разнообразных флавоноидов [113, 234, 347], которые оказывают антиканцерогенное действие [214, 302] и поэтому перспективны для сопровождения радиотерапии [257] и химиотерапии [288]. Примечательно, что антиоксидантной эффективностью обладают не только полифенолы с низкой молекулярной массой [119], но и гуминовые полифенольные композиции, которые

способны защищать макромолекулы, в частности ДНК, от окислительного повреждения [309].

Одной из актуальных проблем радиобиологии остается поиск и разработка новых средств профилактики и терапии радиационных поражений. Это связано как с возможными аварийными ситуациями на промышленных объектах, использующих радиационные технологии, в частности на атомных электростанциях, так и с возросшей террористической угрозой, в т.ч. и радиологической. Только несколько гематопозитических колониестимулирующих факторов разрешены к применению в качестве радиопротекторов по решению Управления по контролю пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA) [308]. Одно из перспективных направлений решения этой проблемы — использование малотоксичных веществ биологического происхождения или их аналогов, в том числе комплексных органических соединений металлов переменной валентности, которые, по данным литературы, могут обладать радиозащитным действием [150, 237, 315]. В настоящее время в ряде стран (Индия, Китай и др.) антиоксиданты и антиоксидантные комплексы растительного происхождения рассматривают в качестве наиболее перспективных противолучевых средств ввиду хорошей переносимости при весьма высокой эффективности, доступности и возможности наработки в больших количествах [72, 170]. Полифенольные соединения (розмариновая кислота [352], ликопен [147] и флавоноиды [13, 336]) оказывают радиопротекторные эффекты, опосредованные различными механизмами. В качестве радиозащитных средств разрабатываются индукторы биосинтеза отдельных ферментов антиоксидантных систем, например, металлотионеинов [108]. Органические лиганды, связанные с ионами металлов, позволяют не только существенно снизить токсичность соединений и улучшить их проникающую способность, но и придают им новые свойства, например, Mn, Zn или Cu-супероксиддисмутазные активности [194, 315]. Молибден, необходимый микроэлемент, участвует в качестве кофактора в ферментах системы детоксикации [56]. Комплексные органические соединения, содержащие металлы с переменной валентностью, являются перспективными радиозащитными и

радиомитигирующими средствами [237, 315]. Один из возможных механизмов действия подобных растительных комплексов полифенольного происхождения может заключаться в способности этих соединений нейтрализовывать свободные радикалы [198] и подавлять окисление липидов, индуцированное γ -излучением [362]. Радиозащитное действие комплексных органических соединений металлов переменной валентности описано во многих работах. Так, в 1964 г. Л.А. Тиуновым и соавт. была изучена противолучевая эффективность пентаэтиленгексамин-железосодержащего комплекса [43]. По данным ряда авторов, комплексы металлов с ацилгидразами проявляют достаточно выраженную радиозащитную активность, которая в ряде случаев обеспечивает выживаемость 40–60 % животных, облученных в абсолютно смертельной дозе [9]. Ряд металлосодержащих соединений на основе хлорофилла может обладать радиозащитными свойствами [46], а аналогичные порфириновые комплексы металлов переменной валентности, особенно цинка, являются перспективным классом не только радиопротекторов, но и средств, применяемых в пострадиационном периоде.

Лигнин и его производные обладают низкой токсичностью и широким спектром биологических эффектов. В частности, производные лигнина обладают противовирусным действием [58, 278], оказывают противовоспалительное [290], антидиабетическое [80, 166] и противоопухолевое [32, 81, 344] действие. Кроме того, гидролизный лигнин используется в качестве энтеросорбента [55]. Из растворенных в щелочи лигнинов после получения целлюлозы получают биоразлагаемые и безопасные наночастицы для доставки лекарств, в частности, антибактериальные серебряные композиции [145, 283]. Антиоксидантная активность, присущая полифенольным соединениям, считается ведущей в механизме действия соединений подобных лигнину [260, 276, 320]. Таким образом, разработка новых лекарственных средств на основе гидролизного лигнина представляется перспективным направлением. Этим определяется актуальность проведенного нами исследования инновационных водорастворимых композиций ВР-С2 («бипи-сидва») и ВР-С3 («бипи-ситри»). В качестве основы в них использованы бензолполикарбоновые кислоты (полифенольные соединения),

полученные из нерастворимого гидролизного лигнина при высокотемпературном щелочном гидролизе в присутствии кислорода воздуха. Композиция ВР-С2, разработанная в качестве радиопротектора, включает молибден. Композиция ВР-С3 разработана как средство сопроводительной терапии и геропротектор, и включает в состав также соединения железа, селена, аскорбиновую кислоту и ретинол.

Степень разработанности темы

Одно из перспективных направлений исследований в области онкологии – поиск способов уменьшения побочных эффектов противоопухолевого лечения. Активно ведутся исследования по возможности использования малотоксичных веществ биологического происхождения, среди которых полифенолы, в качестве потенциальных средств для применения в онкологии. Различные полифенольные соединения растительного происхождения изучаются как в экспериментах, так и в клинических исследованиях. К наиболее изученным из них можно отнести женьшень (*Panax spp.*) и его сапонины [342], кроцин и каротиноиды шафрана (*Crocus sativus*) [73], куркумин [264], кверцетин [197], прополис (смесь сотен полифенолов) [55], ресвератрол [138] и другие.

Лигнины – наименее изученная группа полифенолов в отношении их химиофилактического и химиотерапевтического потенциала [109]. Фармакологические эффекты производных лигнинов достаточно широки, в частности, они рассматриваются как средства для лечения диабета (лигносульфовая кислота), ожирения (лигнофенолы), ВИЧ-инфекции (лигносульфовая кислота, комплексы лигнин-углеводы), эмфиземы и в качестве антикоагулянтов (сульфатированные низкомолекулярные лигнины) и др. Лигнины рассматриваются также в качестве потенциальных нано-систем доставки лекарств [338].

Работ по исследованию производных гидролизного лигнина в качестве средств сопроводительной терапии онкологических пациентов для ускорения естественных процессов восстановления повреждений иммунной, кроветворной и пищеварительной систем, особенностей взаимодействия с химиопрепаратами и лучевым лечением в отечественной и зарубежной литературе практически нет. Это послужило основанием для проведения комплексного исследования полифенольных композиций ВР-С2 и ВР-С3 на основе природного гидролизного лигнина.

Цель исследования

Установить биологическую активность и охарактеризовать безопасность водорастворимых полифенольных композиций, полученных на основе природного гидролизного лигнина и обосновать возможность их применения в качестве инновационных препаратов сопроводительной терапии у онкологических пациентов.

Задачи исследования

1. Определить основные активные компоненты и возможные молекулярные мишени действия полифенольной основы композиций ВР-С2 и ВР-С3 на панели мишеней *in vitro*.
2. Исследовать фармакокинетику полифенольной основы композиций ВР-С2 и ВР-С3 *in vivo*.
3. Определить влияние композиции ВР-С3 на повреждающие эффекты химиотерапевтических препаратов.

4. Оценить эффективность различных схем химиотерапевтического лечения с использованием сопроводительного введения композиции ВР-С3 на онкологических моделях *in vivo*.
5. Выявить и охарактеризовать радиопротекторные свойства композиции ВР-С2 при общем однократном γ -облучении, оценить ее безопасность в опытах на грызунах.
6. Оценить эффекты композиции ВР-С2 при лучевом воздействии на опухоль на моделях *in vivo*.
7. Оценить канцерогенную безопасность длительного применения полифенольной композиции ВР-С3 на основе природного гидролизного лигнина в хроническом опыте у мышей.

Научная новизна исследования

Впервые охарактеризован новый класс препаратов на основе полифенольных соединений, полученных из гидролизного лигнина, в качестве средств восстановительной терапии на мелких лабораторных животных-опухоленосителях, получавших химиотерапевтическое или лучевое лечение.

Установлено, что новой композиции ВР-С2 свойственно радиозащитное действие в среднелетальном диапазоне доз при облучении всего тела с фактором изменения дозы 1,1-1,2; изучены механизмы радиомитигирующего действия ВР-С2.

Впервые выявлен защитный эффект композиции ВР-С3 по отношению к токсическому действию цитостатиков, применяемых в клинической практике, проявляющийся без уменьшения их противоопухолевой активности.

Впервые в хроническом опыте у мышей самок SHR проведена оценка канцерогенности композиции ВР-С3. Охарактеризована фармакокинетика полифенольной основы и безопасность композиций ВР-С2 и ВР-С3 при длительном применении в опытах на грызунах.

Теоретическая значимость работы

Результаты исследования расширяют представления о биологических эффектах полифенольных соединений природного происхождения, в частности на основе гидролизного лигнина. Полученные данные свидетельствуют о высокой степени безопасности исследованных композиций. Выявленное их защитное действие в отношении пищеварительной и кроветворной систем организма при воздействии повреждающих факторов, позволяет рассматривать эти композиции как основу для получения новых молекул с определенным механизмом действия. Получены данные о клеточных мишенях, при взаимодействии с которыми могут реализовываться эффекты производных гидролизного лигнина, а при моделировании *in silico* сформирована база данных по структурным основам веществ, активность которых хорошо сопоставима с биологической активностью на панели мишеней.

Показано, что полифенольный лиганд ВР-Сх-1 может изменять фармакокинетику тяжелых металлов, что открывает новые направления в токсикологических и фармакологических исследованиях.

Полученные данные о способности полифенольных производных гидролизного лигнина уменьшать токсические эффекты ксенобиотиков указывают на перспективность их исследований не только в медицине, но также в ветеринарии, сельском хозяйстве.

Практическая значимость работы

Широкое внедрение предложенного решения позволит расширить арсенал безопасных отечественных средств восстановительной медицины. Указанные средства могут быть использованы у онкологических пациентов, получающих химиотерапевтическое или лучевое лечение, для ускорения естественных регенеративных процессов в организме.

Предложен оригинальный метод оценки фармакокинетики полифенольных соединений, применимый в случае исследования сложных композиций на их основе. Метод заключается в введении тритиевой метки в структуру соединений. Данный метод позволил выявить различия биодоступности полифенольных соединений на основе гидролизного лигнина при их внутривенном и пероральном введении.

Композиция ВР-С3, обладающая геропротекторной и антиканцерогенной активностью может быть рекомендована к использованию для профилактики первичных и вторичных новообразований у человека.

Установлено, что композиция ВР-С2 обладает радиопротекторными свойствами в отношении общего облучения в диапазоне среднелетальных доз на двух видах грызунов.

Полученные данные позволяют расширить практическое использование одного из побочных продуктов, получаемого в виде гидролизного лигнина при производстве этанола из древесины.

Методология исследования

Объектами исследования были две полифенольные композиции на основе природного гидролизного лигнина – ВР-С3 и ВР-С2. Исследование проводилось на различных модельных системах *in vitro* и *in vivo*. Были охарактеризованы потенциальные биологические мишени взаимодействия полифенольной основы изучаемых композиций, проведена оценка ее фармакокинетики. Проведена оценка безопасности при курсовом применении композиций ВР-С3 и ВР-С2. В опытах на лабораторных грызунах на моделях токсических миелодепрессии и энтерита были исследованы биологическая активность и эффективность композиции ВР-С3 для уменьшения токсического действия ряда химиопрепаратов, установлена эффективная доза у мышей. В экспериментах на моделях спонтанного и индуцированного опухолевого роста у мышей было изучено взаимодействие

композиции ВР-С3 с эффективностью и токсичностью химиопрепаратов. Радиобиологическими методами была изучена радиопротекторная эффективность композиции ВР-С2, установлена эффективная доза у мышей и крыс. На моделях перевиваемых опухолей была проведена оценка взаимодействия композиции ВР-С2 с эффективностью и токсичностью лучевого воздействия. Для оценки безопасности дополнительно проведено исследование канцерогенности изучаемых полифенольных композиций на примере ВР-С3 у мышей-самок линии SHR.

Положения, выносимые на защиту

1. При системном (внутривенном) введении полифенольных соединений на основе природного гидролизного лигнина (полифенольного лиганда ВР-Сх-1) органами преимущественного накопления являются легкие, печень, почки и селезенка. При пероральном введении полифенольный лиганд характеризуется низкой абсолютной биодоступностью, его концентрации в органах животных на несколько порядков меньше, чем при внутривенном введении.
2. Композиция ВР-С3 уменьшает токсическое действие химиопрепаратов из групп алкилирующих агентов и антиметаболитов в отношении органов гемопоэза и лимфопоэза, а также кишечного эпителия.
3. Композиция ВР-С3 не уменьшает эффективность противоопухолевого лечения различных режимов химиотерапии на моделях опухолевого роста у мышей.
4. Композиция ВР-С2 оказывает противолучевое действие при общем γ -облучении в среднелетальном диапазоне доз. Оптимальная радиозащитная доза для крыс составляет 93,7 мг/кг, величина фактора изменения дозы — 1,2. Оптимальная радиозащитная доза для мышей составляет 81 мг/кг, величина фактора изменения дозы — 1,1.
5. Композиции ВР-С2 и ВР-С3 обладают высокой безопасностью. Длительное применение ВР-С2 и ВР-С3 в широком диапазоне доз не оказывает токсического

воздействия на организм лабораторных мышей и крыс. ВР-С3 угнетает спонтанный канцерогенез и обладает геропротекторным действием у самок мышей SHR.

Личное участие автора в получении результатов

Автором самостоятельно проведены основные этапы диссертационного исследования – сформулированы цель, задачи, проведено планирование экспериментов на животных и *in vitro* (включая разработку и выбор моделей, характеристику групп, изучаемые параметры, разработаны протоколы исследований), получен ряд экспериментальных данных, проведены обобщение и анализ данных, обоснованы выводы исследования. Автором лично проведена статистическая обработка результатов исследований и подготовлен иллюстративный материал диссертационного исследования, описывающий результаты опытов по оценке эффективности композиций ВР-С2 и ВР-С3 на животных. Самостоятельно проведен анализ данных отечественной и зарубежной литературы в отношении темы работы.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты диссертационного исследования достоверны и обоснованы, что обеспечивается достаточным объемом материала (в опытах использованы 1105 мышей и 921 крыса), сопоставлением результатов с необходимыми контролями, проверкой гипотез на нескольких моделях, использованием современных методов экспериментальной онкологии, радиобиологии, токсикологии, морфологического и молекулярного исследования, применением адекватных методов статистического анализа данных.

Результаты работы были представлены в докладах на XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные

противоопухолевые препараты» (17–18 марта 2016 г., Москва, Россия), на 42-й конференции Европейского общества радиационных исследований (4–8 сентября 2016 г., г. Амстердам, Голландия), на 22-й конференции по ядерной медицинской обороне - ConRad 2017 (8–11 мая 2017 г., г. Мюнхен, Германия), на III Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2017» (23–24 июня 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), на 3-й летней школе по хемоинформатике (5–7 июля 2017 г., г. Казань, Россия), на заседании ученого совета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (30 октября 2018 г., Санкт-Петербург, Россия), на межфакультетском семинаре МГУ им. М.В. Ломоносова по химии гуминовых веществ (21 февраля 2019 г., Москва, Россия) и на секции «Перспективы геропротекторов как противораковых средств» V Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2019» (23 июня 2019 г., г. Санкт-Петербург, Россия).

Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, ГК 14.740.11.0115 «Разработка методов комплексной биологической оценки новых противоопухолевых, антиканцерогенных и геропротекторных средств на примере препаратов на основе гуминовых кислот» и Российского научного фонда, проект 16-15-00142 «Разработка новых препаратов на основе полифенольных соединений в качестве средств восстановительной терапии для онкологических пациентов, получающих химиотерапевтическое или лучевое лечение» на 2016-2018 годы.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационной работы внедрены в практическую деятельность Общества с ограниченной ответственностью «Нобель» (Россия), в частности данные о специфической активности, безопасности и фармакокинетике новой полифенольной композиции ВР-С2 отражены в Брошюре исследователя, которая

будет включена в заявку для получения разрешения на проведение международного многоцентрового рандомизированного двойного слепого клинического исследования ВР-С2 для профилактики радиационно-индуцированных дерматитов у пациенток со злокачественными опухолями наружных половых органов (Фаза 1-2). Результаты исследования также внедрены в образовательную деятельность по направлению подготовки 04.05.01 «Фундаментальная и прикладная химия», квалификация выпускника «Химик. Преподаватель химии» в следующих дисциплинах «Применение радиоактивных индикаторов», «Практикум по радиохимии» на Химическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Публикации

По теме диссертационного исследования опубликованы 20 работ, в том числе 15 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов докторских диссертаций. Получен один патент на изобретение.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, библиографического списка и приложения.

Общий объем диссертации составляет 267 страниц с 57 таблицами и 25 рисунками. Список литературы включает 364 источника, в том числе 313 иностранных.

1. Обзор литературы

1.1. Побочные эффекты противоопухолевой терапии

Эффективность противоопухолевой терапии в значительной степени зависит от дозы препаратов и облучения, увеличение которых практически всегда приводит к побочному действию – повреждению здоровых органов и тканей. Согласно практическим рекомендациям Российского общества клинической онкологии поддерживающая терапия у онкологических больных имеет важное клиническое значение и ее необходимость обусловлена развитием среди таких пациентов ряда сопутствующих нежелательных явлений, включающих анемию, тошноту и рвоту, патологию костной ткани, фебрильную нейтропению, гепатотоксичность, нефротоксичность, сердечно-сосудистую токсичность, дерматологические реакции, тромбэмболические осложнения, хронический болевой синдром, иммуноопосредованные явления и другие [33]. Более 100 химиотерапевтических препаратов используются в онкологической практике, отдельно или в сочетании с другими лекарственными средствами или методами лечения. Как правило, в схемах лечения онкологических пациентов оптимальная доза как химиотерапевтического, так и лучевого воздействия, близка к максимально переносимой, что сопровождается развитием нежелательных явлений в 50-90% случаев [23, 24, 39, 41]. Развитие осложнений ухудшает качество жизни пациентов и сокращает ее продолжительность. Своевременное выявление и коррекция осложнений улучшает результат лечения пациентов.

Одни из наиболее частых и грозных осложнений связаны с нарушением гемопоэза. Развитие анемии отрицательным образом влияет на качество жизни онкологических больных, продолжительность их жизни и снижает эффективность некоторых цитотоксических препаратов и лучевой терапии. Для коррекции анемии применяются гемотрансфузии, препараты-стимуляторы эритропоэза, внутривенное введение препаратов железа, витамины [29]. Одним из тяжелых

осложнений химиотерапии, особенно при применении комбинированных режимов, является фебрильная нейтропения, которая может приводить к инфекционным осложнениям, сепсису и смерти. Высоким риском развития этого осложнения обладают режимы химиотерапии, включающие доксорубицин, паклитаксел, доцетаксел, цисплатин, циклофосфамид, 5-фторурацил и другие препараты. Развитие этого осложнения требует немедленного начала противомикробной терапии. Кроме этого, применяются колониестимулирующие факторы для стимуляции кроветворения, однако эти препараты сами по себе не лишены побочных эффектов [38].

С высокой частотой возникают такие побочные эффекты как тошнота и рвота. Широко применяемые в комбинированных режимах химиотерапии цисплатин, циклофосфамид, антрациклины, таксаны и другие препараты обладают умеренным (рвота у 30-90% больных) и высоким (рвота у 90% больных и более) эметогенным потенциалом. В качестве средств профилактики и лечения применяются блокаторы NK-1 рецепторов, блокаторы 5-HT₃ рецепторов, глюкокортикоиды. Профилактика и лечение тошноты и рвоты при проведении лучевой терапии проводится с учетом зоны облучения (область верхней части живота, краниоспинальная зона). Возможно развитие неконтролируемой тошноты и рвоты, требующей назначения препаратов резервного списка: бензодиазепины, D₂-блокаторы, фенотиазины, бутирофеноны [11].

Не редким феноменом является нарушение функционирования органов вследствие повреждения ксенобиотиками, в качестве которых выступают лекарственные средства, применяемые при лечении онкологических больных. Наиболее значимыми с клинической точки зрения являются повреждения печени, сердца и почек. Нарушать функцию печени могут такие широко применяемые препараты, как 5-фторурацил (повышение АСТ/АЛТ в 70% случаев), циклофосфамид (повышение АСТ/АЛТ в 70% случаев), доксорубицин (повышение АСТ/АЛТ в 40% случаев), цисплатин (умеренное повышение АСТ/АЛТ), доцетаксел (умеренное повышение АСТ/АЛТ) и другие [44]. Нормальное функционирование почек является залогом выведения из организма большого

количества ксенобиотиков. Восстановление функции почек и общая выживаемость при остром поражении почек у онкологических пациентов ниже, чем в остальной популяции. Острая почечная недостаточность у онкологических пациентов нередко прогрессирует, приводя к развитию терминальной почечной недостаточности. Часто функция почек нарушается при применении цисплатина, циклофосфида, метотрексата, гемцитабина, доксорубина, производных нитрозомочевины и ряда других препаратов. Развитие гепатотоксичности и/или нефротоксичности приводят к необходимости снижения дозы противоопухолевого препарата, вплоть до его полной отмены, что негативно влияет как на качество жизни пациента, так и на эффективность его лечения [14, 44].

Ионизирующее излучение является важным методом лечения различных злокачественных заболеваний. Более 50-70% всех онкологических больных нуждаются в лучевой терапии в определенный момент времени [136, 345]. Однако развитие радиационно-индуцированных изменений кожи является значительным неблагоприятным эффектом лучевой терапии. Развитие нежелательных явлений (прежде всего локальных или со стороны иммунной системы) приводит к необходимости коррекции дозы и лучевого лечения. Неблагоприятные последствия лучевой терапии значительно различаются по степени тяжести, течению и прогнозу. Обычно они классифицируются как острые, поздние и хронические (Таблица 1). Острые реакции могут приводить к серьезным последствиям, которые влияют на качество жизни, а также само лечение [103]. Ранние лучевые дерматиты развиваются в течение 90 дней с момента воздействия. Их профилактику проводят путем гигиены кожи и местного применения кортикостероидов, а при развитии лечат в зависимости от тяжести с помощью антигистаминных средств, противовоспалительных препаратов [103]. Поздние лучевые дерматиты развиваются спустя месяцы – годы после окончания лечения и являются грозным осложнением, рефрактерным к лечению, а также имеют высокий потенциал малигнизации (развивается плоскоклеточный или базальноклеточный рак) [351].

Развитие лучевых дерматитов связывают с воспалительной реакцией на лучевую терапию. Возникновение воспалительного ответа наблюдается уже в начальном периоде лучевой терапии, что обусловлено продукцией активных форм кислорода, активацией клеток иммунной системы и выделением ими провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-5, ИЛ-6, фактор некроза опухоли альфа) и хемокинов (эотаксин, ИЛ-8), рецепторной тирозинкиназы и молекул адгезии (молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), E-селектин, молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (VCAM-1)). Эти факторы создают самоподдерживающееся локальное воспалительное микроокружение из эозинофилов и нейтрофилов, приводя к повреждению ткани и потере защитного барьера [270]. Позже возникает развитие радиационно-индуцированного фиброза, который также опосредуется воспалением, и продолжается от месяцев до нескольких лет. Этот процесс связан с действием трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF), которые регулируют активность фибробластов и способствуют выработке белков внеклеточного матрикса [86]. Окислительный стресс, связанный с воздействием радиации и с развитием воспалительной реакции, является одним из основных патогенетических факторов, которому противостоят антиоксидантные системы, включающие ферменты, такие как супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, а также пептиды, такие как глутатион [345]. Супероксиддисмутаза является первой линией защиты от окислительного повреждения, а липосомальная супероксиддисмутаза снижает экспрессию TGF- β в миофибробластах и действует как противовоспалительный фактор и антиоксидант [223], способствуя клиническому регрессу радиационного фиброза [208].

У 6% пациентов, перенесших лучевую терапию, при последующем прохождении циклов химиотерапии развиваются острые воспалительные реакции в зоне, подвергавшейся облучению. Эти реакции являются специфичными для химиотерапевтического средства и могут развиваться через несколько недель или месяцев после первоначального облучения и последующего химиотерапевтического лечения. К химиотерапевтическим средствам, которые

ассоциированы с подобными нежелательными явлениями, относятся доксорубин, доцетаксел, паклитаксел, гемцитабин, капецитабин, метотрексат, гидроксимочевина, тамоксифен, дактиномицин, винбластин, цетуксимаб и др. [103].

Таблица 1 - Дозозависимые изменения кожи после местного облучения (по [287]).

Последствие лучевой терапии	Доза, Гр	Срок развития
Острые		
Ранняя преходящая эритема	2	часы
Умеренная эритема; эпиляция	6-10	7-10 суток
Выраженная эритема, гиперпигментация	12-20	2-3 недели
Десквамация эпидермиса (сухая)	20-25	3-4 недели
Десквамация эпидермиса (с экссудацией)	30-40	≥4 недель
Изъязвление	>40	≥6 недель
Поздние		
Отсроченное изъязвление	>45	Недели
Некроз/атрофия дермы	>45	Месяцы
Фиброз	>45	6-12 месяцев и более
Телеангиэктазия	>45	6-12 месяцев и более

Профилактика радиационного дерматита является важным фактором в период до и после лучевой терапии. Общие меры, такие как поддержание надлежащей гигиены кожи путем мытья теплой водой и мягким мылом, а также использование неароматизированных увлажняющих средств на водной основе без ланолина, снижают риск развития острого лучевого дерматита. В отношении применения кортикостероидов нет единого мнения, сторонники рекомендуют

применять их на область лечения 1-2 раза в день после каждого сеанса облучения, чтобы уменьшить тяжесть острого лучевого дерматита и уменьшить выраженность симптомов, включая зуд, раздражение, жжение и дискомфорт. Однако может ли применение кортикостероидов повлиять на частоту или тяжесть возможного хронического лучевого дерматита, еще неизвестно [103, 291].

Лечение лучевого дерматита зависит главным образом от тяжести повреждения кожи. Оно направлено на предотвращение вторичной инфекции и применение увлажняющих повязок для поддержания влажной среды на депигментированной коже, что обеспечивает более высокую скорость заживления ран. При тяжелых кожных реакциях на радиотерапию, когда развивается значительный некроз кожи и образуются язвы, лечение требует междисциплинарного подхода и прекращения радиотерапии [103, 291]. Для местного лечения применяется диметилсульфоксид в виде перевязок 5–10% раствора или 10% мази [6]. В настоящее время поиск средств для профилактики и лечения радиационных поражений кожи с достаточной доказательной базой, несмотря на многочисленные экспериментальные и клинические исследования различных методов местного и системного лечения, остается актуальной задачей [103, 291].

Еще одной актуальной проблемой является разработка интервенционных стратегий для снижения заболеваемости радиационно-индуцированными вторичными злокачественными новообразованиями, озабоченность этой проблемой связана с увеличением выживаемости больных раком [136]. В рамках программы Национального института рака США по эпидемиологическому надзору, эпидемиологии и конечным результатам (SEER) было отмечено, что доля вторичных злокачественных новообразований удвоилась за последние три десятилетия (с 9% в 1975–1979 гг. до 19% в 2005–2009 гг.) [238].

Одним из возможных решений может стать использование препаратов, полученных на основе растительного сырья. Многие современные противоопухолевые препараты были получены при изучении противоопухолевых эффектов активных соединений, выделенных из растений. Известно, что

полифенолы растений вследствие их различных биологических эффектов рассматриваются как потенциальные средства для сопутствующей и прямой терапии больных раком [157], большое значение уделяется возможности их применения как средств снижения токсичности химиотерапии [114, 138], учитывая антиканцерогенное действие [214, 302] – для профилактики вторичных опухолей и осложнений радиотерапии, поэтому полифенольные препараты перспективны для сопровождения химиотерапии [288] и радиотерапии [257].

Рассмотренные выше осложнения не исчерпывают весь перечень и не охватывают всё многообразие современных методов противоопухолевой терапии и ассоциированных нежелательных явлений. Поэтому проблема поиска нетоксичных соединений, способных уменьшить частоту и степень нежелательных явлений, не снижающих эффективность противоопухолевого лечения, а, в идеале, увеличивающих его, является крайне актуальной и важной задачей современной онкологии.

1.2. Химиотерапия и антиоксиданты

Поскольку одной из задач лечения онкологического пациента является улучшение качества жизни ведется поиск средств вспомогательного лечения для устранения токсических эффектов, ассоциированных с лечением. В этом плане многообещающими являются полифенолы растений, они перспективны для сопровождения как лучевой [257], так и химиотерапии [288]. Один из основных механизмов действия полифенольных соединений связан с их антиоксидантной активностью, что требует подробного рассмотрения потенциальных эффектов антиоксидантов при их сочетании с химиотерапией. Наибольшей доказательностью обладают данные, полученные в ходе клинических исследований. Проводится большое число клинических исследований по применению антиоксидантных средств при проведении химиотерапии онкологических заболеваний. В двойном слепом рандомизированном

исследовании глутатиона, показано, что он снижал токсичность и улучшал качество жизни женщин с раком яичников, получающих лечение цисплатином, при клинической оценке ответа на лечение авторы отметили тенденцию к лучшему исходу в группе, получавшей глутатион (73% против 62%, $P = 0,25$) [311]. В исследовании Pathak и соавт. (2005) у 136 пациентов с прогрессирующим немелкоклеточным раком легкого изучали одновременное введение высокодозовой антиоксидантной смеси, содержащей витамины С и Е и β -каротин с паклитакселом и цисплатином, оценивали ответ на лечение и выживаемость, но не установили каких-либо преимуществ при сочетании основного лечения с антиоксидантами [266]. В систематическом обзоре рандомизированных клинических исследований антиоксидантов (витамин С, витамин Е, бета-каротин и селен) и химиотерапии было показано, что в целом антиоксидантный статус (общая антирадикальная антиоксидантная емкость) снижается во время лечения рака, однако в связи с большим разнообразием опухолей, применяемых режимов химиотерапии и сопровождающих их антиоксидантов авторы не смогли сделать определенных заключений относительно безопасности и эффективности применения антиоксидантов. Среди клинических исследований, включенных в анализ, только в шести проводилась оценка влияния антиоксидантов на частоту развития рецидивов и выживаемость, из них в трех исследованиях не обнаружено влияния на эти параметры, в двух – получены данные об улучшении выживаемости, и в одном исследовании были значительно лучше результаты одногодичной, но не пятилетней выживаемости [201].

В другом систематическом обзоре контролируемых клинических исследований [235] мелатонина показано, что его применение может улучшить выживаемость пациентов с некоторыми солидными опухолями, получающих химиотерапию, однако не совсем ясно, обусловлен ли этот эффект только антиоксидантным действием этого гормона. Эффективность мелатонина была оценена на 100 пациентах с немелкоклеточным раком легкого, которые были рандомизированы на две группы – одну, получавшую только химиотерапию, и группу химиотерапии и мелатонина. У пациентов, одновременно получавших

мелатонин, как общая частота регрессии опухоли, так и 5-летняя выживаемость были значительно больше. Ни один пациент, получавший только химиотерапию, не был жив через 2 года, в то время как показателя 5-летней выживаемости достигли трое из 49 (6%) больных, получавших химиотерапию и мелатонин. Более того, химиотерапия лучше переносилась пациентами, получавшими мелатонин [217].

Интересно отметить, что в метаанализе рандомизированных исследований по применению различных антиоксидантов для первичной и вторичной профилактики, был сделан вывод о том, что β -каротин, витамин А и витамин Е могут увеличить смертность, а в случае использования витамина С и селена их потенциальные эффекты требуют дополнительных исследований [91].

Хорошо известно, что противоопухолевые средства вызывают окислительный стресс в биологических системах. К противоопухолевым средствам, которые генерируют высокие уровни активных форм кислорода, относятся антрациклины (например, доксорубицин, эпирубицин и даунорубицин), алкилирующие соединения, координационные комплексы платины (например, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин), производные подофиллотоксина (например, этопозид и тенипозид) и камптотецины (например, топотекан и иринотекан). Во время проведения химиотерапии запускается перекисное окисление липидов, формируются многочисленные электрофильные альдегиды, которые могут атаковать различные клеточные мишени. Эти продукты окислительного стресса могут замедлять или приводить к аресту клеточного цикла опухолевых клеток, а также ингибировать апоптоз путем инактивации рецепторов смерти и ингибирования активности каспазы. Эти эффекты также могут снизить эффективность лечения, а использование антиоксидантов во время химиотерапии может улучшить результаты терапии [123].

Полифенольные соединения, представляющие собой природные антиоксиданты, потенциально могут снижать активность ряда противоопухолевых средств. В частности, при введении крысам куркумина (полифенол, содержащийся в индийской специи куркуме *Curcuma longa*) и эпикатехина (полифенол чая и кофе)

уровень разрывов ДНК, индуцируемых в клетках костного мозга этопозидом снижался [264]. Аналогичные данные были получены для флавоноидов кверцетина и его производного – рутина при исследовании на клетках гепатомы человека HepG2 методом ДНК-комет. Оба флавоноида уменьшали повреждение ДНК, вызванное доксорубицином [82]. У мышей с ксенотрансплантатами клеток линии LXFL 529 крупноклеточного рака легкого человека внутрибрюшинное лечение комбинацией кверцетина 20 мг/кг и цисплатина 3 мг/кг привело к значительному торможению роста опухоли по сравнению с лечением только одним из препаратов [169].

В исследовании *in vitro* на клеточных линиях рака яичника и рака эндометрия человека было показано, что добавление 0,01-10 мкМ кверцетина к цисплатину приводило к 1,5-30 кратному усилению цитотоксического действия цисплатина, однако кверцетин не усиливал эффективность адриамицина или этопозиды [293]. Куркумин обладает антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, которые обуславливают его положительные эффекты, в том числе профилактику рака [128]. Куркумин обладает противоопухолевым действием, связанным с ацетилированием гистонов, изменением уровня экспрессии микроРНК, индукцией апоптоза [222, 300].

Учитывая множественные эффекты полифенолов сложно прогнозировать их влияние на эффективность того или иного химиотерапевтического воздействия, кроме этого, результирующий эффект может определяться биологическими особенностями самой опухоли, уровнем доз и другими факторами. Это диктует необходимость проведения клинических исследований с точно определенными условиями, параметрами оценки, критериями оценки эффективности.

Сделать заключение о том, что антиоксидантные добавки были безопасными в большинстве клинических исследований, не представляется возможным, потому что эти исследования не обладали достаточной статистической мощностью для оценки уменьшения выживаемости или опухолевого ответа [205]. Профиль антиоксидантного действия (в частности, прямой антирадикальный эффект) и другие эффекты (например, модуляция внутриклеточных сигнальных путей и

экспрессии генов) этих соединений, а также их различная биодоступность, распределение, метаболизм, фармакодинамические взаимоотношения должны быть изучены для точного понимания возможностей применения того или иного антиоксиданта. В настоящее время имеются ограниченные данные и теоретическое понимание относительно механизмов действия пищевых антиоксидантов, которые позволяют предположить, что при высоких дозах, некоторые из этих соединений, по отдельности или в комбинации, могут усилить действие некоторых схем химиотерапии и / или уменьшить их токсичность без снижения эффективности противоопухолевого лечения [205].

1.3. Лучевая терапия и антиоксиданты

Эффективность лучевой терапии связана с образованием активных форм кислорода и опосредованном ими повреждении тканей [100]. Поэтому соединения, обладающие антиоксидантными свойствами или действием, могут потенциально уменьшать ее эффективность. В настоящее время имеется ряд клинических исследований, в которых исследовали возможные радиомодифицирующие эффекты (т.е. увеличение или уменьшение радиочувствительности) одновременного применения антиоксидантов и лучевой терапии на нормальные ткани и опухоли. Рандомизированных контролируемых исследований антиоксидантов и радиационной терапии описано относительно мало. В основном имеются данные обсервационных исследований, дизайн которых ограничен необъективным выбором пациентов, включаемых в исследование и неизвестными влияющими факторами. Кроме этого, многие исследования, в том числе рандомизированные и контролируемые включают менее 50 пациентов, в этом случае размер выборки слишком мал, чтобы сделать надежные выводы о параметрах выживания пациентов [205]. Рассмотрим результаты некоторых больших исследований более детально.

В слепом, рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании 540 больных раком головы и шеи, которые получали либо α -токоферол (400 МЕ/сутки) с или без β -каротина (30 мг/сутки), либо плацебо одновременно с лучевой терапией, те, кто получил оба антиоксиданта имели статистически значимое снижение на 38% тяжелых, острых побочных эффектов. Тем не менее, этот положительный эффект, сопровождался сокращением на 29% и 56% частоты локального контроля опухоли для группы α -токоферола и группы α -токоферола плюс β -каротин, соответственно [78, 79].

Несколько других исследований свидетельствуют о том, что антиоксиданты могут уменьшить эффективность лучевой терапии. В частности, в исследовании на 54 больных раком головы и шеи, проходивших лучевую терапию и рандомизированно разделенных в группы, получавшие витамин Е или плацебо перед и после каждой суточной дозы облучения, было показано, что введение витамина Е было связано со снижением на 36% симптомов мукозита, но в целом за 2 года наблюдения общая выживаемость пациентов составила в группе витамина Е 32% против 63% в группе с плацебо ($p=0,13$). Возможно, что на этот результат оказало влияние неравномерное включение пациентов с 3 и 4 стадией [144].

В другом исследовании на когорте из 90 пациентов с нематастатическим раком молочной железы, которые получали традиционное лечение (хирургическое лечение, химиотерапия, лучевая терапия и гормональная терапия) отдельно или в комбинации с высокими дозами β -каротина, витамина С, ниацина, селена, коэнзима Q10 и цинка, было показано, что были уменьшены специфическая выживаемость при раке молочной железы (коэффициент риска смерти от рака молочной железы = 1,75 95% ДИ = 0,83-2,69, $p=0,19$) и безрецидивная выживаемость (коэффициент риска рецидивирования = 1,55, 95% ДИ = 0,94-2,54, $p=0,08$). Рандомизированные исследования по изучению эффектов пентоксифиллина (400 мг 3 раза в сутки) и α -токоферола (300 мг 2 раза в сутки) у 66 пациентов с немелкоклеточным раком легкого во время лучевой терапии (46 Гр на область первичного очага и регионарные метастазы, дополнительно 14 Гр на область первичного очага) и в течение 3 месяцев после нее показали, что лучевая

терапия в сочетании с пентоксифиллином и α -токоферолом статистически значимо увеличивают 2-летнюю выживаемость без прогрессирования ($p=0,0223$). Исследование мелатонина (20 мг в сутки) у 30 больных с глиобластомами головного мозга, получавших радиотерапию (60 Гр) до прогрессирования заболевания, показало, что 1-летняя выживаемость была значительно выше в группе с комбинированным лечением, отмечено уменьшение токсического действия основного лечения. Однако предположение о радиосенсибилизации опухолей не были подтверждены в рандомизированном исследовании 2-й фазы у пациентов с метастазами в головной мозг при лучевой терапии (30 Гр, 10 фракций) с высокими дозами мелатонина (20 мг утром или вечером), хотя и не было получено статистически значимых различий медиана выживаемости групп, получавших мелатонин на протяжении всего периода наблюдения была меньше [87, 216, 236].

Препарат амифостин, разрешенный к клиническому применению в США для увеличения радиорезистентности слюнных желез, обладает избирательным действием, связанным с преимущественным захватом активной формы нормальными клетками по сравнению с опухолевыми. В метаанализе 7 клинических исследований амифостина у 601 пациента с немелкоклеточным раком легкого сделан вывод о том, что он незначительно влияет на частоту общего ответа на лучевую терапию, который оценен в 65% а при назначении амифостина он снижен не более чем на 3% [228]. Однако значительно меньшая частота осложнений лучевой терапии (ксеростомия, мукозит) по сравнению с незначительным риском уменьшения эффективности лечения может являться преимуществом для пациентов.

Результаты лечения, вероятно, могут определяться не только локализацией опухоли, режимом применения и сочетанием с определенным антиоксидантом, биологическое действие которого может сводиться не только и не столько к антиоксидантному эффекту. В настоящее время считается, что необходимы дополнительные исследования, чтобы установить возможность применения природных полифенолов в сочетании с лучевой терапией рака. Имеющиеся данные из ограниченного числа рандомизированных контролируемых клинических

исследований показали, что высокие дозы антиоксидантов во время лучевой терапии уменьшают местный контроль опухоли и сокращают выживаемость больных раком. Несмотря на то, что потенциальный «вред» от этой сопроводительной терапии может быть ограничен для применения только некоторых антиоксидантов, неопределенность в том, какие дозы и какие соединения являются безопасными, диктуют необходимость избегать приема высоких доз любого антиоксиданта во время лучевой терапии, если нет четких доказательств превышения выгодой потенциального риска их применения [205].

1.4. Основные классы полифенольных соединений

Фенольными соединениями называют большой ряд веществ, содержащих как минимум одно ароматическое кольцо, несущее одну или несколько гидроксильных групп, а также их функциональные производные от низкомолекулярных веществ до больших и сложных. Некоторые соединения содержат функциональные азотные группировки, химическая структура нетипичных полифенольных соединений слишком сложна для их группировки или категорирования. Полифенольные соединения включают несколько основных классов соединений [16, 256]. Основные классы полифенолов приведены на рисунке (Рисунок 1). Полифенолы найдены во всех высших растениях и в большинстве низших [15]. Это один из самых больших компонентов растений, состоящий из нескольких тысяч индивидуальных соединений, что создает сложность во всестороннем их описании даже для определенного вида растения [330].

Толчком к изучению роли полифенольных соединений в организме животных стало открытие Альбертом Сент-Дьёрдьи в 1938 г полифенольной структуры веществ группы витамина Р [162].



Рисунок 1 – Основные классы натуральных растительных полифенолов по Ouyenihi and Smith, 2019, с изменениями

К наиболее распространенным фенольным соединениям растительного происхождения относятся флавоноиды. Молекула флавоноида содержит реактивные гидроксильные и карбонильные группы, двойные связи, наличие которых обеспечивает их биологическую активность, кроме этого фенольные соединения обладают антиоксидантной активностью, которая связана, с одной стороны, со способностью образовывать комплексы с ионами тяжелых металлов и этим связывать активирующий аутоокисление агент, с другой – способностью действовать в качестве акцепторов свободных радикалов [49]. Следует отметить, что флавоноиды обладают низкой токсичностью и относятся к III и IV классам опасности по ГОСТ 12.1.007-76.

Несмотря на значительные успехи в изучении молекулярно-генетических механизмов онкологических заболеваний, природные соединения не потеряли своего значения, так за период с 1981 по 2006 год 47,1% из 155 одобренных для клинического применения противоопухолевых лекарственных средств были не модифицированные соединения естественного происхождения или их

полусинтетические производные, или даже молекулы, синтезированные на основе моделей природных веществ. Один из наибольших вкладов с точки зрения чистых молекул внесли вторичные метаболиты растений, а именно полифенолы, обладающие важными эффектами как *in vitro* так и *in vivo* [109].

1.5. Противоопухолевые эффекты полифенольных соединений

Полифенольные соединения длительное время исследуются в качестве средств профилактики и лечения рака. Химиопрофилактика рака связана с модуляцией наследственной или приобретенной под воздействием канцерогенов измененной экспрессией генов, уменьшением действия усиливающих канцерогенез факторов, таких как окислительное повреждение макромолекул, воспаление, влиянием на пролиферацию и метастазирование клеток и другими механизмами. Окислительный стресс является одним из наиболее важных и хорошо изученных факторов, приводящим к возникновению и прогрессированию опухоли [316]. Было показано, что хроническое воспаление может привести к предопухолевым изменениям и тесно связано с окислительным стрессом [243].

Многие эпидемиологические исследования показывают, что диета, особенно богатая фруктами и овощами, обладает профилактическими свойствами против рака [190, 303]. Благоприятное воздействие диеты связано, по крайней мере частично, с полифенолами, которые обладают противоопухолевой активностью как на животных моделях, так и у людей [254]. Полифенолы составляют большую группу соединений, оказывающих цитостатическое действие на опухолевые клетки, а в малых дозах – стимулирующее влияние на процессы репаративной регенерации, кроме этого, в зависимости от дозы вещества проявляют радиозащитный или радиосенсибилизирующий эффект [5, 21]. Высокая противоопухолевая активность и безопасность комплексных препаратов на основе лейкоантоцианидинов и катехинов была показана на моделях различных опухолей у крыс и мышей [21]. Интересно, что природные полифенолы могут индуцировать

апоптотическую гибель предраковых или опухолевых клеток различными механизмами, такими как активация цитохрома С и каспаз, остановка клеточного цикла и модуляция сигнальных путей (NF-κB, JAK/STAT), которые приводят к торможению прогрессирования опухоли [154, 196]. Эпигенетические изменения, такие как метилирование ДНК, уровень ацетилирования гистонов, экспрессия генов, регулируемая микроРНК, и индукция преждевременного старения в опухолевых клетках были определены как противоопухолевые механизмы для многих пищевых полифенольных соединений [233, 321, 335].

Потенциал некоторых природных полифенолов (Таблица 2) может быть использован для профилактики рака [214] и его лечения [141] в дополнение к стандартным противоопухолевым методам лечения, таким как хирургическое вмешательство и химио- / радиотерапия. Приведенные данные дают экспериментальное подтверждение важной роли полифенольных компонентов многих растений, употребляемых в пищу, для которых показаны противоопухолевые эффекты. Несмотря на это, нет натуральных полифенольных экстрактов, которые были бы одобрены или зарегистрированы для клинического использования [259]. Это связано со сложным составом большинства растительных экстрактов, даже несмотря на хорошо известные составляющие, все еще существует относительная нехватка данных о точном составе и, следовательно, возможных дозах индивидуальных соединений. Различия в методах выращивания, качестве почвы и климате могут влиять на состав растительного сырья и его экстрактов. Существует высокий риск несоответствия по составу и доле активных ингредиентов в разных партиях растительных экстрактов, которые могут возникнуть из-за изменений в производственном процессе или качестве растительного сырья [256].

Существует мнение, что использование смесей полифенолов имеет преимущества перед изолированными соединениями, т.к. в случае применения одного вещества требуются относительно высокие дозы для реализации противоопухолевого эффекта, которые могут увеличивать риск побочного действия [184].

Таблица 2 – Механизмы противоопухолевого действия некоторых пищевых растительных полифенолов

Растение	Модель	Механизм действия	Ссылки
Артишок (сумма полифенолов)	Клеточные линии гепатоцеллюлярной карциномы и рака молочной железы	Апоптоз, модификация гистонов, метилирование ДНК	[230, 232, 233]
Виноград и др. (ресвератрол)	Клеточные линии рака желудка, легких и толстой кишки	Апоптоз, окислительный стресс, старение опухолевых клеток, изменение уровня микроРНК	[218, 327, 355, 277]
Гранат (антоцианы)	Клеточные линии рака простаты, множественной миеломы	Апоптоз, окислительный стресс	[132, 189]
Зеленый чай (эпигаллокатехин-3-галлат)	Клеточные линии гепатоцеллюлярной карциномы и рака молочной железы, рака кожи	Апоптоз, модификация гистонов, метилирование ДНК	[248, 329]
Кофе (хлорогеновая кислота)	Клеточные линии рака молочной железы	Метилирование ДНК	[207]
Куркума (куркумин)	Рак легких (мышь) Клеточные линии рака поджелудочной железы, предстательной железы и легких	Апоптоз Модификация гистонов, метилирование ДНК	[222, 300]
Соя (генистеин, дайдзеин)	Клеточные линии рака предстательной железы, рака пищевода, рака молочной железы и почечно-клеточного рака	Апоптоз, модификация гистонов, метилирование ДНК, окислительный стресс	[140, 221, 245, 319]
Томаты (ликопен)	Клеточные линии рака молочной железы	Метилирование ДНК	[300]
Цитрусовые, виноград, чай и др. (кверцетин)	Клеточные линии рака поджелудочной железы	Апоптоз	[275, 364]

Известно, что полифенолы зеленого чая обладают высокими антиоксидантными свойствами и, как следствие, полезными функциями, включая противовоспалительное действие и профилактику рака. С другой стороны, некоторые исследования показали их токсичность в отношении желудочно-кишечного тракта при использовании в высоких дозах, вероятно, из-за их прооксидантных свойств [241].

Кроме хорошо известной для них антиоксидантной активности и связанной с ней способностью предотвращать повреждения, вызванные окислительным стрессом, полифенолы оказывают некоторые биологические эффекты посредством ремоделирования хроматина и других эпигенетических модификаций [279]. Положительное действие полифенолов при лечении рака может быть связано с их способностью обратимо изменять эпигенетические механизмы, участвующие в онкогенезе, приводящие к активации или подавлению экспрессии генов. Сообщается, что многие полифенолы регулируют экспрессию ядерного фактора каппа В (NF-κB) и ремоделирование хроматина путем активации или ингибирования эпигенетических ферментов, таких как гистондеацетилазы (HDAC), гистонацетилтрансферазы (HAT) и ДНК-метилтрансферазы (DNMT) [151]. В частности, некоторые полифенолы с противоопухолевой активностью, такие как генистеин, фенетилизотиоцианат, куркумин, сульфорафан и ресвератрол, влияют на ингибирование деацетилирования гистонов, другие, включая эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG), генистеин и куркумин, действуют на ингибирование ацетилирования гистонов при эпигенетических модификациях [300]. Кроме того, пищевые полифенолы, такие как EGCG, генистеин, ликопин, куркумин и ресвератрол, ингибируют процесс метилирования ДНК, влияя на активность ДНК-метилтрансферазы.

Было показано, что полифенолы могут эпигенетическим путем модулировать сиртуин 1 (SIRT1) [75]. Сиртуины являются подклассом HDAC, которые модифицируют метаболизм, воспаление, старение или клеточный апоптоз при многих патологических процессах. Эпигенетический эффект SIRT1 обусловлен его

способностью деацетилировать многие транскрипционные факторы, такие как p53, NF-κB, FOX- семейство и гистоны [280].

Более подробные механизмы противоопухолевого действия полифенольных соединений других классов могут быть найдены в обширном обзоре [109].

1.6. Влияние полифенольных соединений на токсичность химиотерапевтических препаратов

Полифенольные соединения благодаря своим биологическим эффектам рассматриваются в качестве потенциальных средств для применения в онкологии с целью уменьшения нежелательных явлений химиотерапии, снижение которых позволит улучшить качество жизни пациентов, или увеличить дозы химиотерапии, приведя к увеличению эффективности лечения.

Различные соединения растительного происхождения изучаются как в экспериментах, так и клинических исследованиях. Сапонины женьшеня оказывают защитное действие в отношении генотоксического эффекта циклофосфамидом и индуцированного им апоптоза в клетках костного мозга и периферических лимфоцитах [342], американский женьшень уменьшает тошноту и рвоту, вызванную цисплатином, усиливая его антипролиферативное действие на клетки рака молочной железы человека [340]. У мышей экстракт шафрана (*Crocus sativus*), содержащий кроцин, частично предотвращал снижение массы тела, уровня гемоглобина и количества лейкоцитов, вызванное введением цисплатина. Введение экстракта *C. sativus* также значительно увеличивало продолжительность жизни мышей, получавших цисплатин, почти втрое. Шафран и его каротиноиды обладают хорошими антиоксидантными свойствами и могут защищать клетки от окислительного стресса [73], с чем может быть связано уменьшение токсического действия цисплатина. Другой механизм может быть связан с комплексообразованием и инактивацией алкилирующего соединения экстрактом шафрана и кроцином [247].

Полифенольные соединения также обладают способностью уменьшать токсичность химиопрепаратов. В экспериментах на крысах при введении этопозида наблюдалась миелодепрессия, выражавшаяся в снижении уровня гранулоцитов и лимфоцитов. Введение куркумина уменьшало токсический эффект, вызванный этопозидом. При этом куркумин был более эффективным в этом отношении, чем эпикатехин [264]. Было показано, что кверцетин (в концентрациях 10-100 мкМ) *in vitro* защищает клетки нормального эпителия почечных канальцев от повреждения цисплатином [197]. Кверцетин также снижал уровень аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови у мышей, получавших доксорубин, при этом комбинированное лечение кверцетином и доксорубином значительно тормозило рост ксенотрансплантатов клеток гепатомы человека SMMC7721 у мышей, кверцетин усиливал активацию доксорубином каспазы-9 и апоптоз этой клеточной линии, а на культуре нормальных гепатоцитов L02 добавление кверцетина к доксорубину привело к уменьшению цитотоксичности последнего [341]. В клиническом плацебо-контролируемом исследовании на 23 пациентах кверцетин уменьшал частоту мукозита ротовой полости, однако тяжесть мукозита была более серьезной в группе кверцетина, что могло быть связано с худшим исходным состоянием слизистой ротовой полости у пациентов в этой группе [192]. Традиционное растительное средство японской медицины Saireito при пероральном введении в дозе 100-1000 мг/кг защищает кишечный эпителий во время применения 5-ФУ [186]. Это средство содержит большое количество соединений, среди которых активными веществами считаются тритерпеноидные сапонины, флавоноиды и эфирные масла [354]. Прополис, смесь сотен полифенолов, обладает множеством биологических эффектов, такими как противовирусный, антиоксидантный, противовоспалительный, антипролиферативный, противоопухолевый и иммуномодулирующий, уменьшает токсичность циклофосфида (миелотоксичность, гепатотоксичность, нефротоксичность), доксорубина (нефротоксичность), цисплатина (нефротоксичность, ототоксичность и гепатотоксичность) и блеомицина (фиброз легких) [55]. Ресвератрол, природное

полифенольное соединение, способен восстанавливать повреждения органов, вызванные циклофосфамидом, проявляющиеся в повышении соотношения массы органов к телу для сердца, почек и печени и сопровождаемые изменениями уровня креатинкиназы сыворотки, азота мочевины крови, креатинина, аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы. Использование ресвератрола одновременно с циклофосфамидом восстанавливает функциональные параметры сердца, почек и печени, а также их нормальную гистологию. Ресвератрол устраняет окислительный стресс и воспаление, вызванные циклофосфамидом [138]. В целом, полифенольные соединения обладают способностью уменьшать нежелательные явления химиотерапии, что требует детальных исследований механизмов их действия и клинической апробации.

1.7. Влияние полифенольных соединений на радиационное воздействие

Защита организма человека и животных от воздействия ионизирующего излучения является одной из актуальных проблем радиационной биологии и медицины, в частности онкологии [36, 51]. Лучевая терапия применяется в лечении рака в течение многих десятилетий [22]. Ионизирующее излучение состоит из электромагнитного излучения (фотонов), включая рентгеновское и гамма-излучение, и излучения в виде частиц, такого как электроны, протоны и нейтроны. Клиническая радиационная онкология использует электромагнитное излучение и корпускулярное излучение, в основном электроны и в меньшей степени нейтроны и протоны [121]. Лечебный эффект высокодозной радиотерапии онкологических больных ограничивается развитием серьезных побочных эффектов [88, 349].

Важным условием эффективной лучевой терапии опухолей является различие в радиочувствительности между опухолью и нормальными тканями, которое во многих случаях недостаточно для уничтожения опухоли и излечения

больного. Увеличение дозы радиации приводит к необратимым повреждениям нормальных тканей и ослаблению защитных и барьерных систем организма, несмотря на эффективные способы пространственного распределения дозы радиации, применения различных ее источников. Радиосенсибилизация химическими, физическими и биологическими факторами применяется с целью увеличения эффекта радиационного воздействия на опухоль. Радиосенсибилизаторы в классическом смысле сами не оказывают противоопухолевого действия. Кроме этого, известен эффект потенцирования эффекта радиации соединениями с противоопухолевой активностью, что применяется в схемах комбинированной химиотерапии и лучевой терапии. Известный противоопухолевый препарат 5-фторурацил сочетает в себе свойства радиосенсибилизирующего и радиопотенцирующего препарата, в зависимости от дозы, кроме этого, он синхронизирует клеточные популяции опухоли в определенной фазе клеточного цикла [106]. Важным фактором, влияющим на чувствительность опухоли к радиационному воздействию, является ее насыщение кислородом [100]. Радиация повреждает клетки путем прямой ионизации ДНК и других клеточных мишеней и косвенным воздействием через активные формы кислорода. Воздействие ионизирующей радиации приводит к образованию свободных радикалов кислорода в тканевой среде; к ним относятся, например, гидроксильные радикалы (наиболее разрушительные), супероксидные анионные радикалы и другие окислители, такие как перекись водорода. Дополнительные разрушающие радикалы образуются в результате различных химических взаимодействий. Эти свободные радикалы реагируют с ядерной ДНК, создавая тем самым структурные связи, которые потенциально смертельны для клеток. Некоторые из этих радиационных повреждений могут быть восстановлены, в результате чего клетки остаются жизнеспособными и могут размножаться. Интересно, что, с одной стороны, активные формы кислорода способствуют канцерогенезу, а, с другой стороны, избыточные их количества могут действовать как клеточные токсиканты, которые приводят к остановке роста опухолевых клеток, их апоптозу или некрозу [156]. Несмотря на свою эффективность в

уничтожении опухолевых клеток, активные формы кислорода, образуемые при лучевой терапии, угрожают целостности и выживанию окружающих нормальных клеток [100]. Радиация уменьшает содержание в тканях антиоксидантов, в частности витаминов С и Е [334]. Антиоксидантное действие веществ зависит от парциального давления кислорода в ткани и природы антиоксиданта. Парциальное давление кислорода различается между различными опухолями, то же самое можно сказать и о модулирующем эффекте лучевой терапии антиоксидантами в зависимости от используемого антиоксиданта и парциального давления кислорода в опухоли [359]. Введение антиоксидантов во время лучевой терапии представляет собой дилемму для радиационного онколога, так как антиоксиданты, которые защищают нормальные клетки от активных форм кислорода, могут обеспечивать такие же преимущества для опухолевых клеток и снижать эффективность лечения.

Полифенольные соединения, обладающие свойствами влиять на окислительно-восстановительные процессы, оказывают радиомодифицирующее действие. Радиопротекторные свойства флавоноидов (рутина) при лучевой терапии онкологических больных давно известны и сопряжены с улучшением общего состояния больных, ослаблением лучевых реакций, восстановлением проницаемости и ломкости периферических сосудов [120].

Спектр антиоксидантных фитохимических соединений весьма широкий и включает флавоноиды и другие полифенолы, которые являются антиоксидантами и обладают радиозащитным действием в экспериментальных моделях [347]. Sebastia и соавт. (2014) изучали эффекты куркумина и транс-ресвератрола на лимфоциты человека, при γ -облучении. В неделящихся клетках куркумин и транс-ресвератрол оказывали радиозащитное действие (уменьшая уровень преждевременной конденсации хромосом), тогда как в делящихся клетках в фазе G2 они действовали как радиосенсибилизаторы, увеличивая частоту хромосомных aberrаций [295]. В обзоре эффектов полифенольных соединений у пациентов с опухолями головы и шеи суммированы противоопухолевые эффекты различных групп полифенолов. Для полифенолов зеленого чая, которые включают эпикатехин, эпигаллокатехин, эпикатехин-3-галлат и эпигаллокатехин-3-галлат,

показано, что употребление зеленого чая пациентами с опухолями головы и шеи сопровождается достижением содержания эпигаллокатехин-3-галлата в слюне примерно до 50 μM . Это было ассоциировано с защитой нормальных клеток слюнной железы и уменьшением повреждений, вызванных химиолучевым терапевтическим воздействием γ -облучения с цисплатином. Наряду с этим, отмечена и защита опухолевых клеток, что уменьшало эффективность химиолучевой терапии. Несмотря на это, авторы считают, что растительные полифенолы обладают потенциалом уменьшать побочные эффекты химиолучевой терапии и увеличивать выживаемость пациентов, снижать частоту рецидивов, однако, требуются дополнительные исследования механизмов действия этих соединений и клинические исследования их эффективности [115, 353].

1.8. Биологические эффекты полифенольных соединений на основе лигнина

Лигнин (от лат. *lignum* – дерево, древесина) представляет собой природный полимер, образующий стенки клеток сосудистых растений и некоторых водорослей. Технические лигнины представляют собой группу сложных фенольных полимеров, отличающихся процессом получения (Рисунок 2), доступных в больших количествах (более 70 миллионов тонн в год) в качестве побочных продуктов производства целлюлозной массы (растворы сульфатных и бессернистых лигнинов) и этанола из лигноцеллюлозной биомассы (твердый остаток гидролизного лигнина). Лигнины традиционно считаются биологическими отходами; небольшое количество (приблизительно 2%) технических лигнинов используется для производства вторичных продуктов, а оставшаяся часть используется для получения энергии [139].

На основании первой предложенной структуры лигнина, он представляет собой высоко разветвленный полимер, состоящий из различных фенилпропановых звеньев, с различными функциональными группами, включая гидроксильные

(алифатические и ароматические), карбоновые, карбонильные и метоксильные группы [53].

Из-за хорошей доступности и возобновляемости лигнины представляют собой отличный источник для производства ценных функциональных молекул, они содержат многочисленные химические функциональные группы, среди которых фенольные гидроксильные и метоксильные группы, в частности, обуславливают их биологическую активность [143].

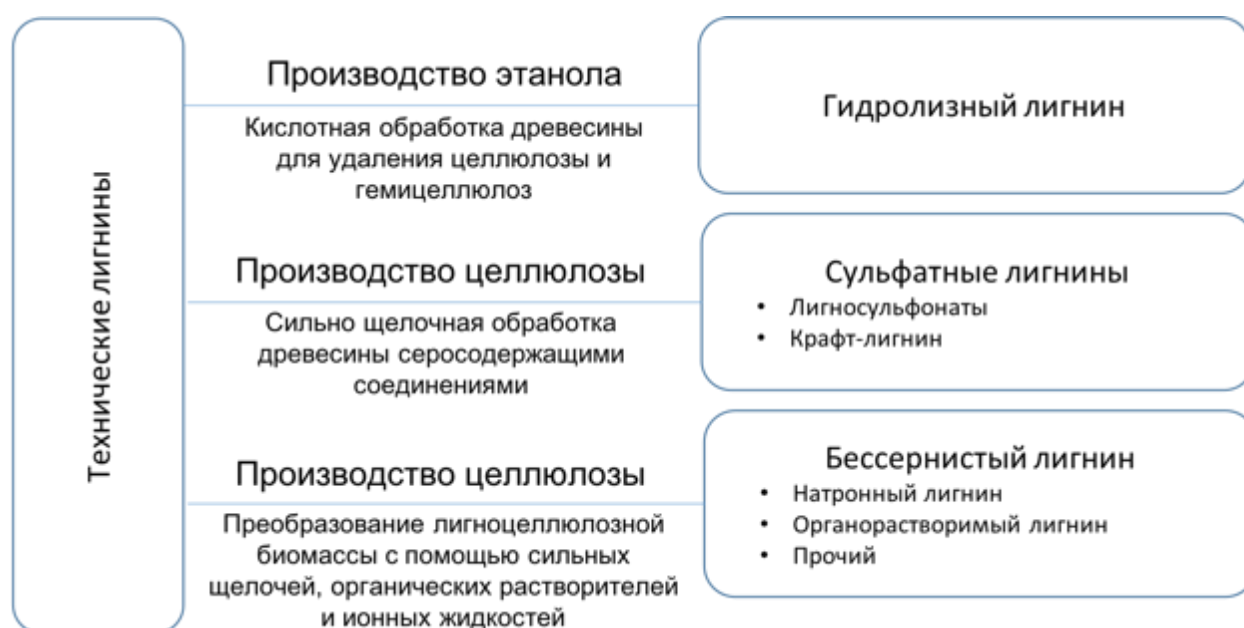


Рисунок 2 – Основные виды технического лигнина, по [52] с изменениями

Одним из наиболее изученных свойств лигнинов является их антиоксидантная активность, что определяет их потенциальное использование в качестве природных добавок для замены синтетических и полусинтетических соединений в косметических, фармацевтических и полимерных композициях [139, 333]. Оценка местной переносимости промышленных лигнинов, полученных из разных источников, при изучении раздражающего действия на глаза и кожу показала, что все изученные лигнины обладают высокой антиоксидантной активностью и безопасностью [339].

Антиоксидантная активность лигнинов связана с тремя возможными механизмами: (1) лигнин действует как хелатирующий агент, удаляя металлы из реакции Фентона, (2) лигнин действует как «самоубийственный» антиоксидант, принимая гидроксильные радикалы для предотвращения действия этих радикалов на другие молекулы-мишени или (3) ингибирует ферменты, участвующие в метаболических путях, которые способны генерировать свободные радикалы [139]. Лигнин действует как инактиватор свободных радикалов из-за присутствия в нем фенольных структур [276], которые работают как ловушки различных радикалов, в частности супероксид-аниона [224].

В медицине применяется гидролизный лигнин в качестве энтеросорбента растительного происхождения, который показан при острых отравлениях лекарственными препаратами, алкоголем, солями тяжелых металлов, алкалоидами, при дизентерии, дисбактериозе, диспепсии, пищевых токсикоинфекциях, сальмонеллезе, при интоксикациях, связанных с гнойными воспалительными заболеваниями, печеночной и почечной недостаточностью, при пищевой и лекарственной аллергии и др. [26].

Лигнины, возможно, наименее изученная группа полифенолов в отношении их химиопрофилактического и химиотерапевтического потенциала [109], однако исследования в этом направлении имеют важное значение, т.к. лигнины настолько устойчивы к приготовлению пищи, что попадают в диету из продуктов, их содержащих. Противоопухолевые свойства лигнинов изучаются достаточно давно. Производные лигнина, полученные с помощью процесса сульфитной варки, были эффективны при асцитической саркоме 180, обеспечивая выживаемость 50-60% мышей. Противоопухолевая активность лигносульфонатов кальция лиственных деревьев и хвойных деревьев была схожей на этой модели. Дальнейшее щелочное окисление или деметоксилирование лигнинов, удаленных из древесины при получении целлюлозы, вызывало уменьшение их противоопухолевой активности [242]. Показано, что противоопухолевой активностью обладают лигнины, полученные путем горячей водной экстракции из чаги (*Inonotus obliquus*), эти лигнины ингибировали активацию ядерного транскрипционного фактора NF-κB в

опухолевых клетках [344]. В ветеринарной медицине применяется препарат «Лигфол», полученный из лигнина путем гидролиз-экстрагирования лигнин-содержащего сырья с добавлением пирофосфата (в соотношении по сухой массе 25:17), обладающий противоопухолевой, противовирусной активностью [32] и радиозащитным действием в диапазоне среднелетальных доз облучения [17]. Различные фракции лигнина, полученные из древесины *Acacia nilotica* путем экстракции растворителем под давлением, показали значительную способность поглощать оксиды азота, гидроксильные и супероксидные радикалы, они обладают высокой способностью восстанавливать ионы трехвалентного железа. Разные фракции лигнина оказывали цитотоксическое действие в отношении клеточной линии рака молочной железы (MCF-7), и не влияли на культуру нормальных перидцитов печени человека (клетки Ито, линия HНSteC). Эти данные свидетельствуют о том, что экстракты лигнина из древесины *A. nilotica* обладают потенциалом для разработки противоопухолевых препаратов [81].

Лигнины обладают антимуtagenным и антиканцерогенным действием, которое связано с их сорбционной способностью и антиоксидантными свойствами, в частности, было показано значительное уменьшение разрывов цепей ДНК в тесте ДНК-комет клеток легких хомяка V79 и толстой кишки человека Caco-2 подвергнутых воздействию N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина [200]. Модифицированные крафт- и предгидролизные лигнины являются эффективными адсорбентами и ингибируют мутагенность, индуцированную 4-нитрохиолин-N-оксидом. Эти соединения лигнина проявляли защитное действие от повреждения ДНК перекисью водорода в клетках хомяка V79, и в клетках карциномы толстой кишки человека VH10 и Caco-2. В отношении N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина лигнины уменьшали алкилирование ДНК из-за их высокого сродства к адсорбции N-нитрозосоединений [193]. Ингибирующая активность в отношении УФ-индуцированного мутагенеза *Euglena gracilis* была показана для бессернистого лигнина, причем его окисленные производные проявили большую антимуtagenную активность, чем восстановленный лигнин, а немодифицированный лигнин обладал наименьшей антимуtagenной активностью

[85]. Антигенотоксическая активность лигнинов была показана в отношении различных генотоксичных соединений, включая N-нитрозодиэтиламин, 1,2-дибром-3-хлорпропан, офлоксацин, 4-нитрохинолин-N-оксид, 3-(5-нитро-2-фурил) акриловая кислота, 2-нитрофлуорен и др. Это свойство лигнинов представляется весьма перспективным для их применения в качестве природных антимуtagenных и антиканцерогенных соединений [139].

Следует отметить, что фармакологические эффекты производных лигнинов достаточно широки, в частности, они рассматриваются как средства для лечения диабета (лигносульфовая кислота), ожирения (лигнофенолы), ВИЧ-инфекции (лигносульфовая кислота, комплексы лигнин-углеводы), эмфиземы и в качестве антикоагулянтов (сульфатированные низкомолекулярные лигнины) и др. Лигнины рассматриваются также в качестве потенциальных нано-систем доставки лекарств [338].

Таким образом, полифенольные производные лигнинов представляют собой большую группу соединений с разнообразной активностью, обладают большим потенциалом для разработки новых лекарственных средств, что подтверждается активными исследованиями последних лет различными научными группами во всем мире.

В связи с этим представляется целесообразным установить закономерности биологического действия полифенольных производных лигнина, определить основные активные компоненты и их возможные молекулярные мишени действия, исследовать их безопасность и фармакокинетику. Необходимо провести оценку влияния данных соединений на повреждающие эффекты химиотерапевтических препаратов и лучевого воздействия на моделях *in vivo*, в том числе у животных-опухоленосителей, и, таким образом, обосновать перспективность их применения в качестве инновационных препаратов сопроводительной терапии.

2. Материалы и методы исследования

2.1. Характеристика объектов исследования

2.1.1. Полифенольная основа из гидролизного лигнина для композиций ВР-С3, ВР-С2

Полимер ВР-Сх-1 (бипи-сиикс-один) состоит из бензолполикарбоновых кислот (полифенольных соединений), полученных из нерастворимого гидролизного лигнина при высокотемпературном щелочном гидролизе в присутствии кислорода воздуха с последующим выделением и очисткой [301].

ВР-Сх-1 используется как несущий лиганд в противоопухолевом препарате платины ВР-С1 [204], в композиции – радиопротекторе ВР-С2 [30, 107] и в геропротекторной композиции ВР-С3 [3].

В соответствии с протоколом производства, ВР-Сх-1 является многокомпонентной смесью полифенольных соединений, что обусловлено жидкофазным гидролизом для приготовления водорастворимых производных лигнина. Принципиальным отличием композиции ВР-Сх-1 от других полифенольных полимеров, полученных из природного сырья, является низкая степень окисления, высокое содержание ароматических структур и отсутствие азот- и серосодержащих компонентов. Все использованные в данном исследовании серии продукта соответствовали следующему элементному составу: С 62-67%, Н 3,7-4,8%, О 29-34%, и N 0-0,1%. Содержание прочих элементов, в том числе металлов, не превышало 1,0 %.

На протонных и углеродных спектрах ЯМР обнаруживаются пики, свидетельствующие о присутствии ароматических соединений, которые представляют собой основную часть ВР-Сх-1, и метоксильных групп. Он также содержит карбоксильные и карбонильные группы, которые образуются при окислении исходного лигнина [143].

Для исследования, представленного в разделе 4.1.2 настоящей диссертации, посвященного установлению лиганд-рецепторных механизмов, вещество дополнительно было охарактеризовано масс-спектрометрическими методами: высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ МС) и масс-спектрометрией ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием с мягкой ионизацией (МС ИЦРПФ). Применение существующих методов характеристики, в том числе ВЭЖХ МС, к многокомпонентным составам лигнина и его производных очень сложная задача; МС ИЦРПФ является единственным методом, который способен решить эту проблему [143]. Это связано с беспрецедентно высокой разрешающей способностью данного метода масс-спектрометрии, способного разрешить до миллиона стехиометрий атомов углерода с различным химическим окружением.

Соединениям, содержание которых в составе композиции более 1% по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии, были приписаны индивидуальные брутто-формулы по данным МС ИЦРПФ, которые далее использовали для скрининга с помощью хемоинформатики. Работы по характеристике лиганда были выполнены на базе МГУ имени М.В. Ломоносова и Сколковского института науки и технологий.

Всего в составе ВР-Сх-1 были идентифицированы брутто-формулы для 2146 одно- и 1602 двузарядных ионов.

В целом ВР-Сх-1 – производное лигнина, использованное в этом исследовании, – по составу характеризовалось доминирующим вкладом полифенольных соединений с молекулярной массой от 300 до 1200. Да наряду с наличием низкомолекулярной части алифатического характера (терпеноиды, жирные кислоты) и конденсированных ароматических соединений (флавоноиды).

2.1.2. Композиция ВР-СЗ

ВР-СЗ (бипи-ситри) представляет собой водорастворимую композицию, разработанную совместно ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России и ООО «Нобель» (Санкт-Петербург, Россия, патент RU 2522547) [3]. Композиция включает инновационный полимер ВР-Сх-1, соединения железа, селена, аскорбиновую кислоту и ретинол.

Для коррекции возможного дефицита микроэлементов, связанного с длительным применением бензолполикарбонатовых кислот, обладающих хелатирующими свойствами, в состав композиции ВР-СЗ были введены селен и железо. Низкие концентрации селена в плазме крови ($< 40-60$ $\mu\text{г/л}$) связывают с повышенным риском развития рака легкого [180], кишечника [210] и простаты [177]. Всасывание железа, относящегося к незаменимым микроэлементам, существенным образом снижается при употреблении пищевых полифенолов: катехинов, флавонолов, флаванолов, флавонов, антоцианов, проантоцианидинов и фенольных кислот. Аскорбиновая кислота устраняет этот негативный эффект полифенольных веществ [323]. Поэтому в состав композиции наряду с железом введена аскорбиновая кислота.

Исследования последних лет показывают, что принятые в клинической практике дозы известных антиоксидантов – ретинола (25-350 мг в день) и аскорбиновой кислоты (200-1000 мг в день), не имеют положительного влияния на продолжительность жизни и риск развития рака [134], также как и не улучшают исходов основного противоопухолевого лечения онкологических пациентов [165], более высокие дозы вызывают ряд нежелательных явлений [313].

С другой стороны, в литературе имеются данные о свойствах ретиноидных препаратов снижать токсичность ряда противоопухолевых средств, а также об эффективности их совместного применения с интерфероном-альфа-2а для лечения Т-клеточной лимфомы и рака шейки матки [74, 313]. Авторы также считают, что это не единственные формы (и локализации) рака, при которых использование ретиноидов может давать положительный эффект.

В соответствии с этим, для коррекции дефицита витаминов, неизбежно возникающего у пациентов, получающих химиотерапевтическое лечение, в состав композиции ВР-СЗ введены пониженные дозы аскорбиновой кислоты и ретинола.

В опытах использовали композицию, которая содержит компоненты в следующем соотношении на сухую массу: ВР-Сх-1 - 99,51%, железо (II) - 0,20%, селен (IV) - 0,002%, аскорбиновая кислота - 0,20% и ретинол - 0,081%. Модификация ВР-СЗ была связана с введением более высокой дозы ВР-Сх-1 в исследованиях с химиотерапевтическими средствами, при этом уровень микроэлементов и витаминов был сохранен на том же уровне, что и в геропротекторном продукте [67].

Для опытов композиция ВР-СЗ использовалась в виде 0,5% водного раствора. ВР-СЗ для исследований *in vivo* готовили *ex tempore*. Свежеприготовленные растворы хранили в холодильнике при температуре $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ и использовали в течение 2 недель. В качестве растворителя для приготовления растворов с меньшей концентрацией использовали стерильную воду для инъекций. Растворитель использовали для введения в группах контроля эффекта «плацебо».

2.1.3. Композиция ВР-С2

ВР-С2 (бипи-сидва) представляет собой водорастворимую композицию полимера ВР-Сх-1 с молибденом – незаменимым микроэлементом, который является кофактором ферментов различных систем детоксикации организма млекопитающих [56]. Для опытов композиция ВР-С2 использовалась в виде 2% водного раствора субстанции, содержащей 1,5% ВР-Сх-1 и 0,5% молибденокислого аммония. Разработана лекарственная форма в виде 0,7% раствора для перорального применения в ампулах по 5 мл. На основании исследований ее стабильности при температуре $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение 2 лет и при температуре $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 6 месяцев рекомендованы условия хранения при комнатной температуре, установлен срок годности в 2 года. В качестве растворителя для приготовления растворов с меньшей

концентрацией использовали стерильную воду для инъекций. Растворитель использовали для введения в группах контроля эффекта «плацебо».

2.2. Животные

2.2.1. Источник и условия содержания

Исследования проводили на лабораторных мышах и крысах (питомник лабораторных животных Рапполово, Россия, питомник лабораторных животных «Столбовая», Россия).

В исследованиях безопасности, фармакокинетики и эффективности были использованы 24 крысы самки и 654 крысы самца Вистар (масса тела 180-200 г), 360 мышей самцов СВА (масса тела 18-22 г), 90 мышей самцов С57BL/6 (масса тела 18-22 г), 36 мышей самок BALB/c (масса тела 18-22 г), 265 мышей самцов и 120 мышей самок SHR (масса тела 25-30 г). Модели опухолевого роста воспроизводили у 243 крыс самцов Вистар массой тела 160-180 г (прививали лимфосаркому Плисса), 105 мышей самцов BALB/c массой тела 25-30 г (прививали карциному кишечника АКАТОЛ), 39 мышей самцов и 43 мышей самок SHR массой тела 25-30 г (индуцировали саркомы мягких тканей введением бенз(а)пирена) и у 47 мышей самок линии FVB, трансгенных по HER-2/neu со спонтанными опухолями молочных желез (собственная разводка).

Животные, поступающие из питомника, проходили карантин длительностью не менее 14 суток. При первичном осмотре экспериментальных животных обращали внимание на их общее состояние, двигательную активность, состояние шерстяного покрова и видимых слизистых. Больных и некондиционных животных выбраковывали. Отобранных животных содержали в условиях вивария при 12-часовом цикле свет / темнота при 21 ± 2 °C со средней влажностью 20-50% и свободным доступом к лабораторному корму (ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия) и водопроводной воде.

2.2.2. Этические нормы при проведении опытов с животными

Экспериментальных животных содержали в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, 8-е издание [250]. Для уменьшения количества лабораторных животных, использованных в опытах, руководствовались принципами «трех R» - Replacement, Reduction, Refinement: замещение, уменьшение/сокращение, совершенствование [249]. Протоколы исследования были рассмотрены и одобрены локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (выписка №1/179 из протокола № 14 Комитета по этике от 30.10.2018; Санкт-Петербург, Россия).

Способы эвтаназии животных.

Животные, обнаруженные в терминальном состоянии, подвергались эвтаназии методом ингаляции CO₂ (животные считались умирающими, если они набирали 8–9 баллов по критериям сниженной активности, прищуриванию глаз и сгорбленной позе, каждый из которых оценивался по шкале от 1 до 3 баллов, а также в случае потери массы тела более чем 20% или 30% для радиобиологических экспериментов). В конце исследования экспериментальные животные были умерщвлены с использованием ингаляции CO₂ или цервикальной дислокации.

2.3. Модели опухолевого роста

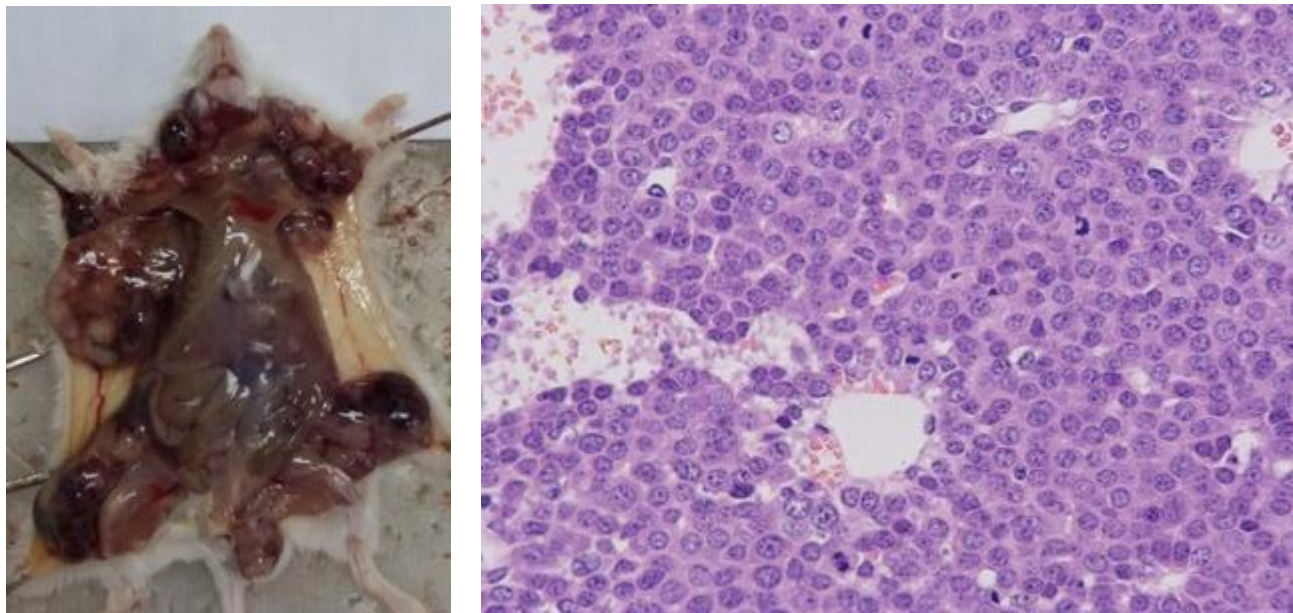
Карцинома толстого кишечника АКАТОЛ. Экспериментальную опухоль воспроизводили у мышей линии BALB/c путем подкожной перевивки в зону правого бедра клеток опухоли (коллекция опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России). Размороженный штамм опухоли прививали животным-донорам, от которых получали образец опухоли, из которого в асептических условиях готовили суспензию в физиологическом растворе хлорида натрия в концентрации 10⁷ клеток/мл и немедленно прививали животным опытных групп в объеме 0,2 мл [45].

Лимфосаркома Плисса. Экспериментальную опухоль воспроизводили у аутбредных крыс альбиносов путем подкожной перевивки в зону правого бедра лимфосаркомы Плисса (коллекция опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России). Размороженный штамм опухоли прививали животным-донорам, от которых получали образец опухоли, из которого в асептических условиях готовили суспензию в физиологическом растворе хлорида натрия в концентрации 10^7 клеток/мл и немедленно прививали животным опытных групп в объеме 0,2 мл [45].

Саркомы мягких тканей. Индукцию сарком мягких тканей проводили у аутбредных мышей подкожным введением 2 мг бенз(а)пирена (Flucka) в 0,1 мл персикового масла (ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга», Россия) как описано ранее [337]. Саркомы мягких тканей, индуцированные введением бенз(а)пирена, обладают достаточной чувствительностью к циклофосфамиду [1]. Выбор модели канцероген-индуцированных опухолей был обусловлен тем, что в случае использования перевиваемых опухолей у грызунов, исследование проводится на одном штамме, что потенциально может оказать влияние на результаты при исследовании единичной опухоли [66].

Опухоли молочных желез у мышей самок линии FVB, трансгенных по HER-2/neu. Данная модель была апробирована автором и описаны основные ее параметры [261]. У мышей самок дикого типа и трансгенных значительно отличается продолжительность жизни, показатель средней продолжительности жизни мышей дикого типа ($600 \pm 12,2$ дня) превышает в 2,9 раза этот параметр у трансгенных мышей ($278 \pm 5,0$ дней). Эти отличия связаны с различной частотой животных с опухолями, так у мышей дикого типа она составляет 34%, а у трансгенных мышей – 100%. При этом у мышей дикого типа практически отсутствуют аденокарциномы молочных желез, в то время как у трансгенных мышей выявляется только этот тип опухолей (Рисунок 3). Первая опухоль у мышей дикого типа была выявлена в возрасте 499 дней, а у трансгенных животных в возрасте 150 дней. Следует отметить, что в возрасте 6 месяцев почти у 100% трансгенных мышей-самок выявляется одна или несколько независимых ОМЖ

различной локализации. Эти особенности позволяют использовать животных этой линии в качестве удобной модели для оценки эффективности и безопасности различных противоопухолевых препаратов.



А

Б

Рисунок 3 – Аденокарциномы молочных желез у мышей самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu. А. Макрофотография препарата мыши с множественными опухолевыми узлами в проекциях 1-й, 2-й, 4-й и 5-й пар сосков молочных желез слева и 3-й и 4-й пар – справа. Б. Микрофотография аденокарциномы молочной железы, гематоксилин-эозин, ув. ×400

2.3.1. Параметры оценки

Для пальпируемых узлов в протоколах опытов регистрировали размеры и рассчитывали объем опухолевого узла по формуле (1):

$$V = \frac{A \times B^2}{6} \pi \quad (1),$$

где: V – объем опухолевого узла, мм^3 ; A – наибольший диаметр опухолевого узла, мм; B – перпендикулярный ему диаметр, мм. Линейные размеры измеряли с помощью штангенциркуля.

Эффективность лечения оценивали по показателю торможения роста опухоли (ТРО), рассчитанному по следующей формуле (2):

$$\text{ТРО} = \frac{V_c - V_e}{V_c} 100\% \quad (2),$$

где: V_c – средний объем опухолевых узлов в контрольной группе и V_e – средний объем опухолевых узлов в опытной группе [45].

2.4. Методы лабораторной диагностики

2.4.1. Клинический анализ крови

Анализ крови проводили в образцах крови (20-40 мкл), которые были взяты в пробирки, содержащие в качестве стабилизатора K_3 ЭДТА (MiniCollect®; Greiner Bio-One International GmbH, Кремс-мюнстер, Австрия). После забора биологического материала проба крови тщательно перемешивалась, анализ производили через 60-120 мин после забора крови. Кровь с антикоагулянтом может сохраняться при $+4$ °C в течение 24 ч без существенного изменения числа и морфологии клеток. Клинический анализ крови проводили на гематологических анализаторах Mindray BC-2800Vet (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd, Шэньчжэнь, Китай) и Mythic 18 фирмы Orphee Geneva (Швейцария).

2.4.2. Определение клеточности костного мозга

Количество ядросодержащих клеток и анализ клеточного состава костного мозга у животных (мыши и крысы) проводили в день, когда животных подвергали

эвтаназии. У каждого животного извлекали по одной бедренной кости. Глазными ножницами срезали проксимальный конец бедренной кости до вскрытия костномозгового канала. С помощью шприца с иглой, вставленной в дистальный конец бедренной кости, костный мозг выдували в пробирку типа Эппендорф. Готовили суспензию клеток костного мозга бедренной кости путем смешивания 0,02 мл аспирата костного мозга с 0,4 мл 3% раствора уксусной кислоты. Для подсчета использовали камеру Горяева [227]. Подсчитывали число ядродержащих клеток в 100 больших квадратах камеры. Расчет содержания миелокариоцитов (P , $\times 10^9/\text{л}$) производили по формуле (3):

$$P = N \times V \times 200 / 1600 \quad (3),$$

где: N — количество миелокариоцитов в 100 больших квадратах, абс. ед.,
 V — объем камеры Горяева, мм^3 .

Для исследования миелограммы применяли способ быстрой окраски мазков костного мозга. Для этого на сухой нефиксированный мазок костного мозга наливали равномерным слоем 6-10 капель рабочего раствора красителя Лейшмана. Через 20-30 с, не сливая краску, добавляли к ней нагретый на водяной бане до 50-60 °С раствор краски Романовского в количестве, способном удержаться на препарате. Через 3 минуты, не сливая краску, смывали ее сильной струей дистиллированной воды и сушили мазки на воздухе.

Микроскопирование окрашенных мазков костного мозга проводили в световом микроскопе при увеличении $\times 1000$ с использованием масляной иммерсии. Просматривали 100 ядродержащих клеток и определяли процентное содержание основных популяций клеток костного мозга [35].

2.4.3. Биохимический анализ крови

Биохимические исследования проводили на анализаторе Konelab 20 (Финляндия) с использованием коммерческих наборов в соответствии с инструкциями производителя.

2.4.4. Методы оценки антиоксидантной активности

Для исследования относительной антиоксидантной емкости композиции ВР-С2 был использован железо-восстанавливающий метод, в котором ионы железа (III) могут окислять антиоксидант, восстанавливаясь до железа (II). В использованной модификации метода количественные измерения проводили по концентрации окрашенного комплекса двухвалентного железа с 2,2-дипиридиллом [4]. В качестве препаратов сравнения с известной антиоксидантной активностью использовали аскорбиновую кислоту и дигидрокверцетин. Антиоксидантную емкость рассчитывали как отношение содержания окрашенного комплекса в пробе с добавлением ВР-С3 к его содержанию в пробах со стандартными веществами.

Для приготовления 0,001 М растворов антиоксидантов в 1 литре воды растворяли эквивалент соответствующего вещества: 176 мг аскорбиновой кислоты, 304 мг дигидрокверцетина, 1400 мг ВР-С3. Для проведения опыта, в мерные колбы на 50 мл наливали по 25 мл воды, 5 мл 0,01 М водного раствора железо-аммонийных квасцов, 1 мл 1% спиртового раствора 2,2-дипиридила и 0,5 мл 0,001 М раствора одного из антиоксидантов, после чего объем раствора доводили до 50 мл. Измерения оптической плотности полученных растворов проводили через 20 минут с использованием фотоэлектрического фотометра КФК-3 (Загорский оптико-механический завод, Россия) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 512 нм. Для корректного определения, при фотометрических измерениях из оптической плотности смеси, содержащей ВР-С3, вычитали оптическую плотность композиции в использованной концентрации.

Оценку антиоксидантной активности *in vivo* проводили, определяя общую пероксид-разрушающую активность, супероксиддисмутазную активность и концентрацию малонового диальдегида в реакции продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-продукты), в лизате эритроцитов самцов мышей линии BALB/c. В исследование были включены группа биологического контроля из интактных мышей (n=12), группа контрольных животных (n=12), получавших стерильный физиологический раствор внутрибрюшинно в течение 5

последовательных дней (с 1 по 5-й) и на протяжении 8 дней ежедневно с 1 по 8 сутки питьевую воду интрагастрально зондом (0,1 мл на 10 г массы тела), группа животных (n=12), получавших 5-фторурацил внутривентрально в дозе 50 мг/кг в течение 5 последовательных дней (с 1 по 5-й) и на протяжении 8 дней ежедневно с 1 по 8 сутки питьевую воду интрагастрально (0,1 мл на 10 г массы тела), а также группа животных (n=12), которым вводили 5-фторурацил внутривентрально в дозе 50 мг/кг в течение 5 последовательных дней (с 1 по 5-й) и на протяжении 8 дней ежедневно с 1 по 8 сутки ВР-СЗ в дозе 80 мг/кг интрагастрально (0,1 мл раствора на 10 г массы тела). За животными вели наблюдение, ежедневно определяли массу тела, потребление корма и жидкости, тяжесть диареи (по бальной системе: 0: норма (нормальный стул), 1: легкая степень (немного влажный и мягкий стул), 2: умеренная степень (мокрый и неоформленный стул с умеренной окраской шерсти перианальной области), 3: тяжелая степень (водянистый кал с сильным окрашиванием шерсти перианальной области)). Эвтаназия животных проводилась для шести животных из каждой группы в день 6 и 8 методом цервикальной дислокации. Образцы крови отбирались терминально, при эвтаназии. Из крови получали эритроцитарную массу и далее – лизат эритроцитов для определения активности ферментов антиоксидантной системы и концентрации ТБК-продуктов. 100 мкл цельной периферической крови животного разбавляли 300 мкл раствора натрия хлорида 0,9%, ресуспендировали и далее наслаивали на 150 мкл фиколла (плотность 1,077 г/мл, ООО НПП «ПанЭко», Россия), помещенного в пробирку для центрифугирования. Пробирки центрифугировали при 6 000 g при 20 °С в течение 10 минут. Из каждой пробирки отбирали 100 мкл эритроцитарной массы, определяли количество эритроцитов (10^{12}) на гемоанализаторе. Далее к эритроцитарной массе добавляли 900 мкл бидистиллированной воды для получения основного гемолизата. При необходимости, основной гемолизат дополнительно разбавляли бидистиллированной водой.

Определение общей пероксид-разрушающей активности проводили по методу Королюк и соавт. [25]. Измерения оптической плотности полученных растворов проводили не позже, чем через 20 минут с использованием

фотоэлектрического фотометра КФК–3 (Загорский оптико-механический завод, Россия) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения использовали смесь из 1 мл буферного раствора с рН 7,4 и 4 мл молибденово-кислого аммония.

Определение супероксиддисмутазной активности (СОД) проводили по модифицированному методу Сироты Т.В. [40]. О величине активности СОД судили по степени ингибирования скорости аутоокисления адреналина. За 1 усл. ед. акт. (U) принимали 50 % ингибирование реакции; результат нормировали на 10^{12} эритроцитов.

Определение малонового диальдегида (МДА) проводили в реакции образования ТБК-продуктов по методу Владимирова Ю.А. и Арчакова И.М. (1972) [10].

2.5. Патоморфологические методы исследования

Все павшие и подвергнутые эвтаназии животные подвергались патоморфологическим методам исследования в объеме, соответствующем задачам опыта, включая аутопсию с макроскопическим описанием, гистологическое исследование тканей и органов.

На аутопсии опухоли, а также другие патологически измененные органы и ткани, целевые органы вырезали и фиксировали в 10% нейтральном формалине. Выполняли рутинную гистологическую проводку в растворе для гистологической проводки на основе изопропилового спирта «Изопреп» (ООО «Эргопродакшн», Санкт-Петербург, Россия), ткани заливали в парафиновую среду «Гистомикс Экстра» (ООО «Эргопродакшн», Санкт-Петербург, Россия). Из парафиновых блоков готовили гистологические срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином Майера (8 минут при комнатной температуре) с последующей дифференцировкой и подсиниванием, докрасивали эозином (30 секунд при комнатной температуре) (красители производства ООО «Эргопродакшн», Санкт-

Петербург, Россия), обезвоживали, покрывали покровным стеклом с использованием монтажной синтетической среды и изучали с помощью светового микроскопа. Использовали гистологическую классификацию опухолей, предложенную МАИР [331, 332].

2.5.1. Определение органо-весовых коэффициентов

Для оценки органоспецифического токсического действия определяли соотношения массы органа (селезенка, тимус, сердце, печень, почки и др.) и массы тела у животных, которых подвергали эвтаназии. При вскрытии органы иссекали без прилежащих тканей и взвешивали на весах Sartorius Research R 160 P (Sartorius AG, Геттинген, Германия). Рассчитывали соотношение масса органа (мг) / масса тела (мг) и умножали на 10, полученные значения усредняли на группу и сравнивали с контролем [37].

2.5.2. Подсчет количества жизнеспособных крипт кишечного эпителия

Для оценки энтеротоксического действия изучали морфологию крипт тонкого кишечника. На аутопсии иссекали тощую кишку и фиксировали ее в 10% забуференном нейтральном формалине при комнатной температуре в течение 48 часов. После фиксации вырезали 10 поперечных колец высотой 4-5 мм без лимфоидных фолликулов. Проводили рутинную гистологическую проводку и готовили гистологические срезы толщиной 4 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином. Выживаемость кишечных крипт оценивали по методике Withers и Elkind (1970) путем подсчета количества жизнеспособных крипт (не менее 10 клеток с базофильными ядрами, лежащими рядом друг с другом) по меньшей мере в шести поперечных срезах для каждого животного с

использованием светового микроскопа Nikon Eclipse Ni-U, (Nikon Corporation, Токио, Япония) при увеличении $\times 400$ и программного обеспечения NIS - Elements Br (версия 4.30.00; Nikon Corporation, Токио, Япония). Рассчитывали среднее количество выживших крипт для каждой экспериментальной группы [350].

2.5.3. Иммуногистохимические исследования

Ряд маркеров выявляли методом иммуногистохимии (ИГХ) на парафиновых срезах с материала, фиксированного в 10% формалине. Срезы депарафинировали и проводили демаскировку антигенов в цитратном буфере (pH 6.0, Dako Epitope Retrieval Solution (Containing Detergent) (10x), Дания) при 95 °C в течение 30 мин. Затем блокировали эндогенную пероксидазную активность с помощью 3% H₂O₂ в течение 15 мин. После этого срезы инкубировали при комнатной температуре с первичными антителами в течение 1 часа. Использовали поликлональные кроличьи антитела к CD31 (77699s, Cell Signaling Technology Inc.), к Lgr5 (bs-1117r, Bioss Antibodies, Inc.) или к PCNA (proliferating cell nuclear antigen, bs-0754r, Bioss Antibodies, Inc.) После инкубации с первичными антителами проводили трехкратную промывку в трис-солевом буфере по 5 мин и срезы инкубировали при комнатной температуре со вторичными козьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP polymer) (ab214880), Abcam). Затем срезы трехкратно промывали в трис-солевом буфере по 5 мин. После этого на срезы наносили раствор 3'3'-диаминобензидина (ДАБ, Dako) и выдерживали 5 минут. Срезы докрашивали в гематоксилине 5-10 мин, обезвоживали и заключали под покровное стекло синтетической монтирующей средой Biomount. Необходимое разведения первичных антител подбирали путем предварительной окраски тестового материала. Микроскопию проводили на световом микроскопе Nikon Eclipse NiU, оснащенном камерой Nikon Digital Sight DSFi2 и пакетом программного обеспечения NIS Elements Basic Research (Nikon, Япония).

Количественную оценку проводили следующим способом. Для оценки стволовых клеток кишечника клетки Lgr5⁺ подсчитывали в продольно разрезанных криптах, содержащих клетки Панета (просматривали 300-350 крипт на группу и рассчитывали среднее количество клеток на крипту). Процент клеток, экспрессирующих PCNA, подсчитывали до 20-й позиции и оценивали в среднем в 100 криптах на группу. В опухолевой ткани подсчитывали процент клеток, экспрессирующих PCNA, и относительную площадь микрососудов в поле зрения, позитивных по CD-31. Подсчеты проводили с помощью программного обеспечения ImageJ (NIH, США).

2.6. Радиобиологические методы исследования

2.6.1. Характеристика условий облучения

Для моделирования различных по тяжести форм острого радиационного поражения (ОРП) животных подвергали общему относительно равномерному воздействию гамма-квантами на установке «ИГУР-1» (¹³⁷Cs) при мощности дозы 1,01 Гр/мин. Для проведения облучения мышей в количестве до 24 голов, а крыс в количестве до 6 голов помещали в специальный пенал. Животные контрольных и опытных групп подвергали воздействию ионизирующего излучения одновременно. Дозы облучения варьировали от 4,0 Гр до 8,0 Гр. Во время облучения животные не подвергали седации или анестезии. После облучения экспериментальным животным не вводили никаких сопутствующих вспомогательных средств.

Физический контроль величины поглощенной дозы осуществляли дозиметрами ИД-11, которые помещали в одну из центральных ячеек алюминиевого пенала. Определение поглощенной дозы проводили методом радиофотолюминисценции на измерительном устройстве ГО-32-1.

Выбор доз был обусловлен степенью тяжести ОРП. Облучение в дозе 4,0 Гр приводит к развитию у мелких лабораторных животных костномозговой формы ОРП легкой степени тяжести. В этом случае большинство экспериментальных животных может выжить без лечения. При воздействии гамма-квантов в дозе 8,0 Гр развивается костномозговая форма ОРП крайне-тяжелой степени.

Локальное облучение опухоли проводили с использованием комплекса лучевой терапии в ФГБУ «ПНЦ им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт» на базе ускорителя СЦ-1000 протонами с энергией 1000 МэВ стереотаксическим методом, поглощённая доза 10 Гр.

2.6.2. Показатели продолжительности жизни

Для оценки характера течения и исхода ОРП проводили вычисление показателя выживаемости и средней продолжительности жизни (СПЖ). Значение показателя выживаемости (N, %) вычисляли по формуле (4):

$$N = A/B \times 100 \quad (4),$$

где: А – количество животных, выживших к 30-м сут после облучения, абс. ед.;

В – общее количество животных в группе, абс. ед.

Значение СПЖ определяли по формуле (5):

$$\text{СПЖ} = (t_1 + t_2 + \dots + t_i) / i \quad (5),$$

где: СПЖ – средняя продолжительность жизни, сут;

t_1, t_2, \dots, t_i – продолжительность жизни отдельного животного, сут;

i – количество животных в группе, абс. ед.

2.6.3. Оценка объективного статуса экспериментальных животных

Период наблюдения после облучения при определении специфической противолучевой активности составлял 30 суток. Регистрировали наличие или

отсутствие гибели, а также динамику развития основных синдромов ОРП. Ежедневно оценивали общее состояние и поведение экспериментальных животных. Взвешивание осуществляли еженедельно. Кроме того, у животных в эти же сроки определяли динамику потребления корма.

Определение степени тяжести ОРП проводили традиционными методами, основываясь на результатах оценки общего состояния и поведения животных (локомоторной активности, угнетении или возбуждении, агрессивности, пугливости, характерных реакций на внешние раздражители и др.), данных гематологических и патологоанатомических исследований. При осмотре оценивали состояние шерстистого покрова и кожи (взъерошенность шерсти, блеск или матовый оттенок, характер и локализация облысения, эластичность и болезненность кожи, наличие отеков, повреждений, раздражений, нагноений, кровоподтеков и пр.), состояние видимых слизистых (бледность, покраснение, синюшность, набухание, наличие кровоизлияний или эрозий, количество и характер выделений из носовых ходов и др.).

2.6.4. Определение содержания колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс) по методу эндогенного колониеобразования

Определение числа сохранивших жизнеспособность гемопоэтических клеток проводили методом эндогенного колониеобразования по количеству выросших на селезенках лабораторных животных колоний через 8-10 суток после облучения [328]. Для определения числа эндогенных колониеобразующих единиц на селезенке (эндогенные КОЕс) мышей облучали в дозе ЛД_{50/30} (5,7 Гр). После облучения животных подвергали эвтаназии, извлекали селезенки и размещали их на бумажных полосках таким образом, чтобы свободные поверхности селезенок были обращены вверх. Полоски с селезенками помещали в чашки Петри и заливали свежеприготовленной жидкостью Буэна (75 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты, 25 мл 40% раствора нейтрального формалина, 5 мл ледяной

уксусной кислоты) для фиксации и окрашивания. Спустя еще 1 сутки, с помощью бинокулярной лупы, на свободной поверхности селезенки подсчитывали число колоний, имеющих вид бугорков, более светлых, чем остальная поверхность органа, и определяли среднее число колоний.

2.7. Статистическая обработка данных

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали общепринятыми статистическими методами [50]. Статистическую обработку данных исследования выполняли с помощью программного обеспечения MS Excel 2015, SPSS 16.0, GraphPad Prism 6.0.

Использованы методы описательной статистики, параметрические (критерий Стьюдента) и непараметрические (критерий Манна-Уитни, критерий Гехана–Вилкоксона) критерии для парных сравнений, точный метод Фишера для сравнения частотных показателей, множественные сравнения трех и более групп проведены с применением дисперсионного анализа - обычного двухстороннего дисперсионного анализа ANOVA с поправкой на множественные сравнения и пост-тестом Туки, тестом Фишера для выборок с наименее значимой разницей (Least Significant Difference) или без них, дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с пост-тестом Данна на множественные сравнения, анализ выживаемости проводили построением кривых Каплана-Майера с применением логрангового и критерия Мантеля-Кокса.

Вероятность ошибки $p < 0,05$ и менее считали достаточной для вывода о статистической значимости различий полученных данных.

2.8. Схемы опытов

2.8.1. Исследование *in vitro* потенциальных молекулярных мишеней действия ВР-Сх-1 в максимально возможной концентрации на панели DiversityProfileP9 (Cerep, Франция)

Связывание ВР-Сх-1 (серия X112K14A1) исследовали в максимально возможной концентрации 0,0042% (V/V). Максимальная концентрация исследуемых веществ при тестировании на используемой панели мишеней составляет 1% от конечного объема реакции. С учетом концентрации раствора ВР-Сх-1 – 0,42%, максимальная конечная концентрация вещества для тестирования составляет 1/100, т.е. 0,0042%. Реакции проводили в 384-луночных плашках на автоматизированных рабочих станциях Biomek 384 NX (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) и мультифункционалом приборе для измерения флюоресценции, люминисценции и оптической плотности в плашках Infinite M 1000 PRO (Tecan). Исследования выполнены на базе Центра высоких технологий «ХимРар». Активность оценивали по ингибированию связывания специфического лиганда.

2.8.1.1. Условия проведения реакций связывания с рецепторами

A1 рецептор человека - рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [³H]-DPCPX (8-циклопентил-1,3-дипропилксантин, 1 нМ, K_d 1,7 нМ), неспецифическое связывание - DPCPX (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [219].

A2A рецептор человека - рекомбинантный рецептор в клетках HEK-293, лиганд - [³H]-CGS 21680 (6 нМ, K_d 27 нМ), неспецифическое связывание - NECA (5'-(N-этилкарбоксамидо)аденозин, 10 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [219].

A3 рецептор человека - рекомбинантный рецептор в клетках HEK293, лиганд - [¹²⁵I]-AB-МЕСА (4-амино-3-йодо-бензил-5'-N-этилкарбоксамидо-аденозин, 0,15 нМ, Kd 0,22 нМ), неспецифическое связывание - IB-МЕСА (1 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [219].

α1 рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-празозин (0,25 нМ, Kd 0,09 нМ), неспецифическое связывание - празозин (0,5 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [294].

α2 рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-RX 81002 (0,5 нМ, Kd 0,38 нМ), неспецифическое связывание - эpineфрин (100 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [203].

β1 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках HEK293, лиганд - [³H](-) CGP 12177 (0,3 нМ, Kd 0,39 нМ), неспецифическое связывание – алпренолол (50 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [212].

β2 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [³H](-) CGP 12177 (0,3 нМ, Kd 0,15 нМ), неспецифическое связывание - эpineфрин (100 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [182].

AT1 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках HEK293, лиганд – [¹²⁵I][Sar1, Ile8]-AT-I (0,05 нМ, Kd 0,05 нМ), неспецифическое связывание – ангиотензин II (10 мкМ), инкубация 120 мин при 37 °С [284].

AT2 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках HEK293, лиганд – [¹²⁵I]-CGP-42112A (0,01 нМ, Kd 0,01 нМ), неспецифическое связывание – ангиотензин II (1 мкМ), инкубация 4 ч при 37 °С [284].

B1 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд – [³H]-desArg10-KD (0,35 нМ, Kd 0,085 нМ), неспецифическое связывание – [³H]-desArg10-KD (10 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [284].

B2 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд – [³H]-брадикинин (0,3 нМ, Kd 0,32 нМ), неспецифическое связывание – Брадикинин (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [284].

CB1 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [³H]-CB 55940 (0,5 нМ, K_d 3,5 нМ), неспецифическое связывание – WIN 55212-2 (10 мкМ), инкубация 120 мин при 37 °С [284].

CB2 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [³H]-WIN 55212-2 (0,8 нМ, K_d 1,5 нМ), неспецифическое связывание – WIN 55212-2 (5 мкМ), инкубация 120 мин при 37 °С [240].

ССК1 (ССКА) рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [¹²⁵I]-ССК-8s (0,08 нМ, K_d 0,24 нМ), неспецифическое связывание – ССК-8s (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [90].

ССК2 (ССКВ) рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [¹²⁵I]-ССК-8s (0,08 нМ, K_d 0,054 нМ), неспецифическое связывание – ССК-8s (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [90].

CRF1 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [¹²⁵I]-совагин (0,075 нМ, K_d 0,12 нМ), неспецифическое связывание – совагин (0,5 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [90].

D1 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [³H]-SCH 23390 (0,3 нМ, K_d 0,2 нМ), неспецифическое связывание – SCH23390 (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [363].

D2S рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках HEK293, лиганд - [³H]-метилспирон (0,3 нМ, K_d 0,68 нМ), неспецифическое связывание – бутакламо́л (10 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [159].

D3 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [³H]-метилспирон (0,3 нМ, K_d 0,085 нМ), неспецифическое связывание – бутакламо́л (10 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [159].

D4.4 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [³H]-метилспирон (0,3 нМ, K_d 0,19 нМ), неспецифическое связывание – бутакламо́л (10 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [159].

ETA рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [¹²⁵I]-эндотелин-1 (0,03 нМ, K_d 0,03 нМ), неспецифическое связывание – эндотелин-1 (100 нМ), инкубация 120 мин при 37 °С [105].

ЕТВ рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках СНО, лиганд - [¹²⁵I]-эндотелин-1 (0,03 нМ, Kd 0,04 нМ), неспецифическое связывание – эндотелин-1 (100 нМ), инкубация 120 мин при 37 °С [105].

GABA рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-GABA (10 нМ, Kd 15 нМ), неспецифическое связывание – GABA (100 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [105].

H1 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках НЕК293, лиганд - [³H]-пириламид (1 нМ, Kd 1,7 нМ), неспецифическое связывание – пириламид (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [310].

H2 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках СНО, лиганд - [¹²⁵I]-АРТ (0,075 нМ, Kd 2,9 нМ), неспецифическое связывание – тиотидин (100 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [211].

H3 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках СНО, лиганд - [³H]-N α -мегистамин (1 нМ, Kd 0,32 нМ), неспецифическое связывание – (R) α -мегистамин (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [211].

I2 рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-идазоксан (2 нМ, Kd 4 нМ), неспецифическое связывание – циразолин (10 мкМ), инкубация 30 мин при комнатной температуре [211].

BLT1 (LTB4) рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках СНО, лиганд - [³H]-LTB4 (0,2 нМ, Kd 0,2 нМ), неспецифическое связывание – LTB4 (0,2 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [211].

CysLT1 (LTD4) рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках СНО, лиганд - [³H]-LTD4 (0,3 нМ, Kd 0,24 нМ), неспецифическое связывание – LTD4 (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [211].

MC4 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках СНО, лиганд - [¹²⁵I]-NDP- α -MSH (0,05 нМ, Kd 0,54 нМ), неспецифическое связывание – NDP- α -MSH (1 мкМ), инкубация 120 мин при 37 °С [211].

M1 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках СНО, лиганд - [¹²⁵I]-2-йодомелатонин (0,01 нМ, Kd 0,04 нМ), неспецифическое связывание – мелатонин (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [135].

M рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-QNB (0,05 нМ, Kd 0,01 нМ), неспецифическое связывание – атропин (1 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [135].

NK1 рецептор человека – рецептор в клетках U373MG, лиганд - P LYS3 (0,05 нМ, Kd 0,04 нМ), неспецифическое связывание – [Sar9, Met(O2)11]-SP (1 мкМ), инкубация 30 мин при комнатной температуре [267].

NK2 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [¹²⁵I]-NKA (0,1 нМ, Kd 0,12 нМ), неспецифическое связывание – [Nleu10]-NKA (300 нМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [267].

NK3 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [³H]-SR 142801 (0,4 нМ, Kd 0,47 нМ), неспецифическое связывание – SB 222200 (10 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [267].

Y рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [¹²⁵I]-пептид YY (0,05 нМ, Kd 0,1 нМ), неспецифическое связывание NPY (1 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [267].

N-нейрональный $\alpha 4\beta 2$ рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках SH-SY5Y, лиганд - [³H]-цитизин (0,6 нМ, Kd 0,3 нМ), неспецифическое связывание – никотин (10 мкМ), инкубация 120 мин при 4 °С [155].

Опиоидный рецептор человека – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-налоксон (1 нМ, Kd 2,6 нМ), неспецифическое связывание – налоксон (1 мкМ), инкубация 40 мин при комнатной температуре [155].

NOR (ORL1) рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках HEK293, лиганд - [³H]-ноцицептин (0,2 нМ, Kd 0,4 нМ), неспецифическое связывание – ноцицептин (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [343].

PPAR gamma рецептор человека – рекомбинантный рецептор *E. Coli*, лиганд - [³H]-розиглитазон (5 нМ, Kd 5,7 нМ), неспецифическое связывание – розиглитазон (10 мкМ), инкубация 120 мин при 4 °С [343].

EP2 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках HEK293, лиганд - [³H]-PGE₂ (3 нМ, Kd 3 нМ), неспецифическое связывание – PGE₂ (10 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [343].

IP (PGI₂) рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках HEK293, лиганд - [³H]-илопрост (6 нМ, Kd 8 нМ), неспецифическое связывание – илопрост (10 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [343].

P2Y рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³⁵S]-dATPαS (10 нМ, Kd 10 нМ), неспецифическое связывание – dATPαS (10 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [343].

5-HT1 рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-серотонин (2 нМ, Kd 0,61 нМ), неспецифическое связывание – серотонин (10 мкМ), инкубация 10 мин при 37 °С [239].

Сигма рецептор человека – эндогенный рецептор в клетках Jurkat, лиганд - [³H]-DTG (10 нМ, Kd 41 нМ), неспецифическое связывание – галоперидол (10 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [343].

GR рецептор человека – цитозоль клеток IM-9, лиганд - [³H]-дексаметазон (1,5 нМ, Kd 1,5 нМ), неспецифическое связывание – триамцинолон (10 мкМ), инкубация 6 ч при 4 °С [118].

ER рецептор человека – цитозоль клеток MCF7, лиганд - [³H]-эстрадиол (0,4 нМ, Kd 0,2 нМ), неспецифическое связывание – 17-β-эстрадиол (6 мкМ), инкубация 20 ч при 4 °С [118].

PR рецептор человека – цитозоль клеток T47D, лиганд - [³H]-прогестерон (0,5 нМ, Kd 2 нМ), неспецифическое связывание – промегестон (1 мкМ), инкубация 20 ч при 4 °С [118].

AR рецептор человека – цитозоль клеток LnCAP, лиганд - [³H]-метилтриенол (1 нМ, Kd 0,8 нМ), неспецифическое связывание – миболерон (1 мкМ), инкубация 24 ч при 4 °С [361].

TRH1 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [³H]-Me-TRH (2 нМ, Kd 3,9 нМ), неспецифическое связывание – TRH (10 мкМ), инкубация 120 мин при 4 °С [361].

V1A рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [³H]-AVP (0,3 нМ, Kd 0,5 нМ), неспецифическое связывание – AVP (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [322].

V2 рецептор человека – рекомбинантный рецептор в клетках CHO, лиганд - [³H]-AVP (0,3 нМ, Kd 0,76 нМ), неспецифическое связывание – AVP (1 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [322].

2.8.1.2. Условия проведения реакций связывания с ионными каналами

BZD канал – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-флунитрацепан (0,4 нМ, Kd 2,1 нМ), неспецифическое связывание – диазепам (3 мкМ), инкубация 60 мин при 4 °С [318].

AMPA канал – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-AMPA (8 нМ, Kd 82 нМ), неспецифическое связывание – L-глутамат (1 мМ), инкубация 60 мин при 4 °С [318].

Каинат канал – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-каиновая кислота (5 нМ, Kd 19 нМ), неспецифическое связывание – L-глутамат (1 мМ), инкубация 60 мин при 4 °С [318].

NMDA канал – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-CGP 39653 (5 нМ, Kd 23 нМ), неспецифическое связывание – L-глутамат (100 мкМ), инкубация 60 мин при 4 °С [304].

PCP канал – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-TCP (10 нМ, Kd 13 нМ), неспецифическое связывание – МК-801 (10 мкМ), инкубация 120 мин при 37 °С [304].

P2X канал – крысиный мочевой пузырь, лиганд - [³H]- α,β -MeATP (3 нМ, Kd 2,6 нМ), неспецифическое связывание – α,β -MeATP (10 мкМ), инкубация 120 мин при 4 °С [304].

Ca²⁺ канал (L, дигидропиридиновый сайт) рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-нитрендипин (0,1 нМ, Kd 0,18 нМ), неспецифическое связывание - нитрендипин (1 мкМ), инкубация 90 мин при комнатной температуре [158].

Ca²⁺ канал (L, дилтиаземовый сайт) рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-дилтиазем (15 нМ, Kd 52 нМ), неспецифическое связывание - дилтиазем (10 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [158].

Ca²⁺ канал (L, верапамиловый сайт) рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-D888 (3 нМ, Kd 3 нМ), неспецифическое связывание – D-600 (10 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [158].

K (АТР) канал рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-глибенклами (0,1 нМ, Kd 0,05 нМ), неспецифическое связывание – глибенклами (1 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [158].

K (V) канал рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [¹²⁵I]-α-дендротоксин (0,01 нМ, Kd 0,04 нМ), неспецифическое связывание – α-дендротоксин (50 нМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [174].

SK(Ca) канал рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [¹²⁵I]-апамин (0,007 нМ, Kd 0,007 нМ), неспецифическое связывание – апамин (100 нМ), инкубация 60 мин при 4 °С [314].

Na (+), сайт 2 канал рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-батрахотоксинин (10 нМ, Kd 91 нМ), неспецифическое связывание – батрахотоксинин (300 мкМ), инкубация 60 мин при 37 °С [104].

Cl (-) GABA канал рецептор – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³⁵S]-ТВPS (3 нМ, Kd 14,6 нМ), неспецифическое связывание – пикротоксинин (20 мкМ), инкубация 120 мин при комнатной температуре [158].

2.8.1.3. Условия проведения реакций связывания с транспортерами

Норадреналиновый транспортер человека – рекомбинантный в клетках CHO, лиганд - [³H]-нисоксетин (1 нМ, Kd 2,9 нМ), неспецифическое связывание – дезипрамин (1 мкМ), инкубация 120 мин при 4 °С [258].

Дофаминовый транспортер человека – рекомбинантный в клетках CHO, лиганд - [³H]-ВТСР (4 нМ, Kd 4,5 нМ), неспецифическое связывание – ВТСР (10 мкМ), инкубация 120 мин при 4 °С [274].

GABA транспортер – крысиная кора головного мозга, лиганд - [³H]-GABA (10 нМ, Kd 4600 нМ), неспецифическое связывание – GABA (1 мМ), инкубация 30 мин при комнатной температуре [274].

Холиновый (СНТ1) транспортер человека – рекомбинантный в клетках CHO, лиганд - [³H]-хемихолин-3 (3 нМ, Kd 3,9 нМ), неспецифическое связывание – хемихолин-3 (10 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [274].

5-НТ транспортер человека – рекомбинантный в клетках CHO, лиганд - [³H]-имипрамин (2 нМ, Kd 1,7 нМ), неспецифическое связывание – имипрамин (10 мкМ), инкубация 60 мин при комнатной температуре [265].

2.8.1.4. Условия проведения ферментативных реакций

PKC α киназа человека – рекомбинантная, реакция - АТФ⁺ + биотинилированный- β A β A β AKIQASFRGHMARKK (60 нМ), детекция фосфо- β A β A β AKIQASFRGHMARKK с помощью HTRF, инкубация 30 мин при комнатной температуре [324].

СЕНP-E человека – рекомбинантный в клетках *E. Coli*, субстрат АТР (100 мкМ), детекция неорганических фосфатов с помощью фотометрии, инкубация 5 мин при комнатной температуре [153].

Eg5 человека – рекомбинантный, субстрат АТР (50 мкМ), детекция неорганических фосфатов с помощью фотометрии, инкубация 10 мин при комнатной температуре [153].

HDAC-3 человека – рекомбинантный, флуоресцентный субстрат HDAC (50 мкМ), детекция fluoro-lysine с помощью флуоресценции, инкубация 10 мин при комнатной температуре [153].

HDAC-4 человека – рекомбинантный, флуоресцентный субстрат HDAC класса 2a (20 мкМ), детекция fluoro-lysine с помощью флуоресценции, инкубация 30 мин при комнатной температуре [153].

HDAC-6 человека – рекомбинантный в клетках, флуоресцентный субстрат HDAC (25 мкМ), детекция fluoro-lysine с помощью флуоресценции, инкубация 30 мин при комнатной температуре [153].

HDAC-11 человека – рекомбинантный в клетках, флуоресцентный субстрат HDAC класса 2a (30 мкМ), детекция fluoro-lysine с помощью флуоресценции, инкубация 30 мин при 37 °С [153].

Sirtuin-1 человека – рекомбинантный в клетках *E.Coli*, флуоресцентный субстрат HDAC (200 мкМ), детекция fluoro-lysine с помощью флуоресценции, инкубация 20 мин при комнатной температуре [153].

Sirtuin-2 человека – рекомбинантный в клетках *E.Coli*, fluoro-lysine sirtuin 2 deacetylasesubstrate (150 мкМ), детекция fluoro-lysine с помощью флуоресценции, инкубация 60 мин при комнатной температуре [153].

COX1 человека – рекомбинантный в клетках Sf9, субстрат – арахидоновая кислота (4 мкМ), детекция PGE₂ с помощью HTRF, инкубация 5 мин при комнатной температуре [153].

5-липоксигеназа человека – рекомбинантный в клетках Sf9, субстрат – арахидоновая кислота (25 мкМ), детекция родамин 123, инкубация 20 мин при комнатной температуре [226].

PDE1B человека – рекомбинантный в клетках Sf9, субстрат – [³H]-сGMP+сGMP (1,5 мкМ), детекция [³H]-5`-сGMP, инкубация 20 мин при комнатной температуре [226].

PDE2A1 человека – рекомбинантный в клетках Sf9, субстрат – [³H]-сАМР+сАМР (2 мкМ), детекция [³H]-5`-АМР, инкубация 20 мин при комнатной температуре [226].

PDE3A человека – рекомбинантный в клетках Sf9, субстрат – [³H]-сАМР+сАМР (0,5 мкМ), детекция [³H]-5`-АМР, инкубация 20 мин при комнатной температуре [226].

PDE4D2 человека – рекомбинантный в клетках Sf9, субстрат – [³H]-сАМР+сАМР (0,5 мкМ), детекция [³H]-5`-АМР, инкубация 20 мин при комнатной температуре [226].

PDE5 человека – лимфоциты человека, субстрат – [³H]-цГМФ+цГМФ (1 мкМ), детекция [³H]-5`-цГМФ, инкубация 60 мин при комнатной температуре [226].

Аденилил циклаза человека – СНО клетки, субстрат – нет, детекция сАМР с помощью НТRF, инкубация 10 мин при комнатной температуре [226].

Гуанидил циклаза человека – рекомбинантный человеческий, субстрат – GTP (100 мкМ), детекция цГМФ с помощью НТRF, инкубация 10 мин при комнатной температуре [226].

Фосфатаза 1B человека – рекомбинантная в клетках *E.Coli*, субстрат – DIFMUP (100 мкМ), детекция DIFMU с помощью флуоресценции, инкубация 30 мин при комнатной температуре [137].

Фосфатаза CDC25A человека – рекомбинантная в клетках *E.Coli*, субстрат – OMFp (20 мкМ), детекция OMF с помощью флуоресценции, инкубация 20 мин при комнатной температуре [137].

Ацетилхолинэстераза – рекомбинантная в клетках HEK293, субстрат – ацетилхолин (400 мкМ), детекция 5-тио-2-нитробензойная кислота, инкубация 30 мин при комнатной температуре [137].

СОМТ (катехол-О-метилтрансфераза) – из печени свиньи, субстрат – эскулетин (1 мкМ), детекция скополетин, инкубация 30 мин при 37 °С [137].

ГАВА трансаминаза – из мозга крысы, субстрат – ГАВА (9 мМ) + α -кетоглутарат (9 мМ), детекция янтарного полуальдегида, инкубация 60 мин при 37 °С [137].

МАО-А человека – плацента человека, лиганд - кинурамин (0,15 мМ), детекция 4-ОН-хинолина, инкубация 30 мин при 30 °С [112].

МАО-В человека – рекомбинантный человека, лиганд – производная D-люциферина (4 мкМ), детекция метилового эфира люциферина, инкубация 30 мин при 37 °С [112].

Тирозин гидроксилаза – стриатум крысы, лиганд – [³H]-тирозин (10 мкМ), детекция [³H]-H₂O, инкубация 40 мин при 37 °С [112].

АТФаза (Na⁺/K⁺) – кора мозга свиньи, лиганд – АТФ (2 мМ), детекция Pi, инкубация 60 мин при 37 °С [112].

Результаты по связыванию представлены как % от контрольного специфического связывания:

$$\left(\frac{\text{Специфическое Связывание}}{\text{Контрольное Связывание}}\right) \times 100\%$$

и как процент ингибирования контрольного специфического связывания в присутствии ВР-Сх-1:

$$100 - \left(\frac{\text{Специфическое Связывание}}{\text{Контрольное Связывание}}\right) \times 100\%$$

Результаты активности в ферментативных эссеях представлены как % от контрольной специфической активности:

$$\left(\frac{\text{Специфическая Активность}}{\text{Контрольная Активность}}\right) \times 100\%$$

и как процент ингибирования контрольной специфической активности в присутствии ВР-Сх-1:

$$100 - \left(\frac{\text{Специфическая Активность}}{\text{Контрольная Активность}}\right) \times 100\%$$

Значения специфического связывания и специфической активности соответствуют значениям, полученным в присутствии ВР-Сх-1 за вычетом неспецифического (фонового) сигнала.

Значения контрольного связывания и контрольной активности соответствуют значениям, полученным в отсутствие ингибирования (добавлен только растворитель) за вычетом неспецифического (фонового) сигнала.

Все измерения были проведены в двух повторах, после чего данные усреднялись.

2.8.2. Моделирование активности полифенольного лиганда ВР-Сх-1 *in silico*

В исследовании использовали базу данных ChEMBL (ver. 22) <https://www.ebi.ac.uk/chembl>. По полученным брутто-формулам для 2146 одно- и 1602 двузрядных ионов в составе ВР-Сх-1 был осуществлен поиск в базе ChEMBL всех возможных структурных формул, соответствующих брутто-формулам, полученных методом МС ИЦРПФ. Проведено отсеивание фрагментов структур, которые не были обнаружены при анализе методом ЯМР. Для оставшихся (около 27 000) структур осуществлялся поиск записей об активности в базе ChEMBL. Хемоинформационный скрининг был проведен в сотрудничестве с ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» и кафедрой химии МГУ имени М.В. Ломоносова.

2.8.3. Исследование фармакокинетики меченного [³H]-Вр-Сх-1 у мышей BALB/c

Введение тритиевой метки в состав лиганда ВР-Сх-1 осуществлялось по методике, описанной в [76, 77], под руководством доцента Бадун Г.А. на кафедре радиохимии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Суть метода заключается в замещении водорода на тритий по связям С-Н химических

соединений, при воздействии на них атомов трития, полученных на нагретой электрическим током вольфрамовой проволоке. Обработка осуществляется в условиях минимально воздействия на тонкий слой вещества, нанесенного на стенки реакционного сосуда лиофилизацией водного раствора. Результатом является неселективное замещение водорода на тритий в полифенольном лиганде с сохранением химического состава и структуры молекул. Обменный тритий удаляют путем диализа до снижения активности промывных вод. Подтверждение сохранения свойств препарата получали с помощью эксклюзионной хроматографии по методике, описанной в [76, 269].

Исходный и меченый препараты имели одинаковые хроматографические профили, а профили оптического поглощения и радиоактивности меченого препарата также совпадали. Далее, образец растворяли в концентрации 5 мг/мл в 0,9% NaCl и доводили до pH 7,0 буферным раствором 10 mM Na₂HPO₄. Концентрацию [³H]-Вр-Сх-1 доводили лигандом без метки до 1% для введения мышам в дозе 80 мг/кг (из расчета введения 0,2 мл на животное массой 25 г). Полученная удельная активность ВР-Сх-1 составляла 14,2 мкКи/мг. Меченый лиганд вводили мышам внутривенно (в хвостовую вену) или перорально интрагастрально металлическим зондом однократно. Внутривенный путь введения выбран как обеспечивающий максимальную биодоступность. Пероральный путь введения выбран как планируемый для клинического применения. Объем введения составил 0,2 мл/мышь. Внутривенное введение осуществляли с помощью пластикового рестрейнера без анестезии.

В исследовании использованы 36 мышей самок линии BALB/c, массой 18,5-22,5 г. Животные распределены на группы для выведения по 3 животных на каждую временную точку. Для внутривенного пути отбор проб осуществляли через 5 минут, 30 минут, 60 минут, 2 часа, 6 часов и 12 часов после введения. Для перорального пути отбор проб осуществляли через 30 минут, 60 минут, 2 часа, 6 часов, 24 часов и 48 часов после введения.

После введения лиганда в соответствующей временной точке мышей подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации для обеспечения

максимально быстрой остановки кровообращения. Для обоих путей введения брали образец цельной крови в виалу с K_2EDTA . Далее производили выделение внутренних органов для исследования содержания в них меченного лиганда (головной мозг, печень, почки (обе), сердце, селезенка, тимус, легкие, яичники (оба)). Тщательно очищенные от окружающих тканей органы были промыты от крови в растворе 0,9% хлорида натрия (400 мл, смену раствора проводили после каждых 3 животных одной временной точки), далее органы просушивали с помощью фильтровальной бумаги и помещали в предварительно маркированные и взвешенные стеклянные виалы.

Виалы с органами взвешивали, рассчитывали массу органов, органы растворяли в жидкости Solvable (PerkinElmer) в соответствии с процедурой, рекомендованной изготовителем. Затем весь раствор или его часть смешивали со сцинтилляционным коктейлем UlinaGold (PerkinElmer) и измеряли радиоактивность трития с использованием жидкостного сцинтилляционного спектрометра Tri-Carb 1600 (PerkinElmer).

Рассчитывали радиоактивность D всего органа в мкКи по формуле (6):

$$D = \frac{DPM - BG}{P \times 2220000} \quad (6),$$

где DPM – измеренная радиоактивность, расп/мин, P - доля препарата, взятая на измерение, BG – фоновое значение, которое составляло от 100 до 200 расп/мин для разных серий препаратов. Для пересчета использовали соотношение 1 мкКи = 2220000 расп/мин.

Затем рассчитывали радиоактивность органа Do на г ткани по формуле (7):

$$Do = \frac{D}{W} \quad (7),$$

где, W - масса органа, г.

Содержание препарата в органе Co в мг/г ткани вычисляли по формуле (8):

$$Co = \frac{Do}{14,2} \quad (8),$$

где 14,2 мкКи/мг - удельная радиоактивность препарата.

2.8.4. Исследования эффективности и безопасности ВР-С2 в опытах на грызунах

2.8.4.1. Исследование курсовой фармакокинетики ВР-С2 по уровню молибдена в крови и накоплению в органах у крыс, оценка кумулятивной токсичности

Опыты выполнены на 24 крысах-самках линии Вистар, рандомизированно разделенных на 4 группы по 6 животных: группа ВР-С2 (интрагастрально 100 мг/кг в течение 2 недель, перерыв 2 недели, затем в дозе 200 мг/кг в течение двух недель), группа Молибдат аммония (молибдат аммония в дозе 25 или 50 мг/кг для первого и второго курса, соответственно), группа ВР-Сх-1 (лиганд ВР-Сх-1 в дозе 75 или 150 мг/кг, соответственно в 1 и 2 курсы) и группа Контроль (0,9% водный раствор NaCl в том же режиме и объеме). Исследование было завершено на 9 неделе.

Токсичность ВР-С2 оценивали на следующем параметрам: динамика массы тела, клинический анализ крови (один раз в неделю) и биохимический анализ крови (трижды за эксперимент), данные аутопсии и гистологического исследования тканей-мишеней (печень и почки).

Для получения фармакокинетических кривых концентрацию молибдена определяли в цельной крови с использованием масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (SF-ICP-MS), работающей при среднем разрешении (Thermo Element2, Thermo Scientific). Перед измерениями образцы крови или тканей были подвергнуты микроволновому расщеплению азотной кислотой. Для аналитической валидации была использована атомно-абсорбционная спектроскопия в графитовой печи. Идентификация композиции ВР-С2 в биологических жидкостях с использованием стандартных аналитических методов невозможна из-за наличия нескольких отдельных структур в её составе и очень низкой чувствительности доступных методов. Следовательно, адсорбцию и распределение ВР-С2 были

определены на основе концентрации молибдена, измеренной в соответствующих образцах.

Подобный подход представляется весьма обоснованным, т.к. позволяет сравнивать фармакокинетику металла в составе полифенольного лиганда и без него. Ранее в нашем исследовании были получены данные о фармакокинетике Pt-содержащего препарата с лигандом ВР-Сх-1 и цисплатина у мышей с опухолью Эрлиха [251]. Содержание платины определяли тем же методом. Было показано, что полифенольный лиганд значительно изменяет распределение Pt в тканях. Pt у мышей, получавших полифенольный препарат, была обнаружена в опухоли в более высокой концентрации, по сравнению с цисплатином. Солидные опухоли, обладают повышенной проницаемостью и, следовательно, удерживающим эффектом для макромолекулярных агентов, таким образом, полифенольный лиганд может способствовать улучшению транспорта Pt. Кроме этого было выявлено, что выведение Pt из крови было несколько замедлено. Изменения фармакокинетики Pt сопровождались уменьшением токсичности, что проявлялось в значительно меньшем снижении веса тела, веса почек и отсутствием гибели животных, при сохранении противоопухолевой активности в отношении опухоли Эрлиха [251]. При определении методом SF-ICP-MS двух лекарственных форм Pt-препарата с лигандом ВР-Сх-1 было показано, что их фармакокинетика и распределение в тканях пропорциональны вводимым дозам [312].

2.8.4.2. Исследование радиозащитной эффективности при остром радиационном повреждении на крысах-самцах Вистар

Эксперименты проведены на 654 крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г., полученных из питомника РАМН «Рапполово» (пос. Рапполово Ленинградской обл.).

Животных подвергали общему, относительно равномерному воздействию гамма-излучения на установке «ИГУР-1» в дозах от 4 до 8 Гр, при мощности дозы

1,01 Гр/мин. Накануне облучения животных не кормили, но не ограничивали в доступе к воде. Все эксперименты проводили в первой половине дня.

Композицию ВР-С2 в виде 0,67 % водного раствора (ООО «Нобель», Россия) вводили крысам внутрижелудочно 10-тикратно, с интервалом через 1 сутки. Объем введения не превышал 3 мл на животное. Облучение подопытных животных проводили после 5-го введения композиции, т.е. на 9-е сутки после начала опыта. В течение 30 суток после радиационного воздействия ежедневно учитывали количество павших и оставшихся в живых животных, динамику их гибели. По итогам наблюдения рассчитывали процент выживших после лучевого воздействия особей, оценивали среднюю продолжительность жизни (СПЖ) животных, величину фактора изменения дозы (ФИД). Величину ФИД композиции ВР-С2 рассчитывали графическим методом путем построения и сравнения прямых регрессии.

С целью выяснения возможных механизмов противолучевого действия композиции ВР-С2 проводили общеклинический анализ периферической крови и анализ клеточного состава костного мозга облученных животных на 3, 10 и 14 сутки.

2.8.4.3. Определение радиозащитной эффективности и механизма действия ВР-С2 на модели острой лучевой болезни у мышей

Эксперименты проведены на 360 мышках самцах линии СВА и 90 мышках самцах линии С57ВL/6 весом 18–22 г (питомник лабораторных животных «Рапполово», Россия).

У 336 мышей оценивали 30-дневную выживаемость при ОРП после облучения гамма-лучами всего тела. Исследовано 3 уровня доз ВР-С2: 1/650, 1/50 и 1/25 от ЛД₁₀ установленной для самцов мышей. 1/25 доза от ЛД₁₀ является лимитированным допустимым объемом введения мышам интрагастрально зондом. Три опытные группы получали ВР-С2 в дозах 6,0 мг/кг, 81,0 мг/кг и 156,0 мг/кг

интрагастрально зондом в объеме 0,2 мл на мышь 10 раз через день с 10 дня до облучения и до 10 дня после облучения. В контрольной группе вводили плацебо в том же объеме и режиме. Все группы были разделены на 5 подгрупп, которые облучали в дозах 4,0 (по 12 мышей), 5,0 (по 12 мышей), 6,0 (по 24 мышши), 7,0 (по 24 мышши) и 8,0 Гр (по 12 мышей), соответственно. Облучение проводили после 5-го введения ВР-С2 или плацебо.

Показатели выживаемости рассчитывали на 30 день после облучения. Был проведен пробит-анализ для расчета летальных доз облучения $LD_{16/30}$, $LD_{50/30}$ и $LD_{84/30}$, рассчитывали величину фактора изменения дозы (ФИД) как отношение $LD_{50/30}$ в группе ВР-С2 к таковому в группе плацебо.

У 24 мышей проводили оценку эндогенного колониеобразования в селезенке. Мышей разделили на две группы (по 12 животных в каждой) - группу плацебо и группу ВР-С2 (81 мг/кг). ВР-С2 вводили каждый второй день (всего 10 раз) до 10-го дня после облучения ($LD_{50/30}=5,7$ Гр на нулевой день опыта). На 10-й день животных подвергали эвтаназии и проводили подсчет эндогенных колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс).

У мышей линии C57BL/6 проводили оценку механизмов противолучевого действия ВР-С2. Исследование было разработано в соответствии с руководящими принципами FDA по тестированию эффективности медицинских контрагентов против ОРП на мышшиной модели [261]. В исходной модели животные были подвергнуты эвтаназии на 3, 8 и 17 сутки после облучения всего тела в дозе 8 Гр. При гистологическом исследовании к 8 суткам были обнаружены очаги миелоидных клеток в костном мозге, в селезенке были обнаружены небольшие герминогенные центры с нечеткими мантийными зонами, в тонком кишечнике отмечались укорочение ворсинок и умеренная потеря крипт с признаками регенерации [271]. Известно, что желудочно-кишечные изменения при ОРП, такие как укорочение ворсин и апоптоз энтероцитов в тонком кишечнике, развиваются к 3-му дню и наблюдаются как минимум до 14-го дня [181]. Таким образом, чтобы уменьшить количество экспериментальных животных с соответствии с принципами «трех R», нами был выбран 8-й день в качестве временной точки для получения образцов для

оценки как гематологических, так и кишечных изменений при ОРП. Мышей рандомизировали на 9 групп (по 10 животных в каждой). Одна группа (контроль) была «ложно-облученной» (животных помещали в пеналы для облучения, но не облучали) и не получала никаких дальнейших воздействий. Восемь других групп были подвергнуты облучению всего тела гамма-лучами в дозах 5,0, 6,0, 7,0 и 8,0 Гр, по две группы на дозу. Через двадцать четыре часа после облучения животным из одной из двух групп, облученных равными дозами, вводили ВР-С2, а другой – плацебо тем же путем и в том же режиме. ВР-С2 вводили через желудочный зонд (81,0 мг/кг, 0,2 мл на животное; эффективная радиозащитная доза, установленная для мышей СВА) ежедневно в течение 7 дней после облучения. Учитывая низкую токсичность ВР-С2, дополнительная группа ложно-облученных животных, получавших ВР-С2 не была включена в исследование. На 8-й день после облучения выживших животных во всех группах подвергли эвтаназии и получали образцы селезенки, костного мозга, тощей кишки и крови. У животных выполняли гематологический анализ периферической крови, подсчет клеточности костного мозга, подсчет эндогенного колониеобразования в селезенке, подсчет жизнеспособных крипт тонкого кишечника, оценивали пролиферативную активность эпителия кишечника и количество стволовых клеток эпителия кишечника Lgr5+.

2.8.4.4. Оценка влияния ВР-С2 на эффективность лучевой терапии

Опыт на модели лимфосаркомы Плисса

Опыты проводили в три серии для надежной оценки воспроизводимости результатов исследования (Таблица 3).

Таблица 3 – Схема исследования и характеристика групп

Группы	Количество животных в группе	Серия опытов		
		1	2	3
1 Интактный контроль	32	10	10	12
2 ВР-С2	34	12	10	12
3 Облучение	34	12	10	12
4 Опухоль	37	15	10	12
5 Облучение + ВР-С2	34	12	10	12
6 Облучение + Опухоль	37	15	10	12
7 Облучение + Опухоль + ВР-С2	35	13	10	12

Эффективная доза ВР-С2, обладающая радиозащитным действием, установленная в предыдущих опытах на крысах, составляет 90 мг/кг. Для расчета суточной дозы исходили из потребления крысой массой тела 220 г питьевой воды 30 мл/сутки. Исходная концентрация раствора составляет 20 мг/мл (2%), для поения животных разводили исходную форму в 30 раз питьевой водой до концентрации 0,67 мг/мл (0,067%) и давали животным в поилках вместо воды на следующие сутки после облучения и до конца эксперимента. Животные групп «плацебо» имели неограниченный доступ к питьевой воде. Накануне облучения животных не кормили, но не ограничивали в доступе к воде. Все эксперименты проводили в первой половине дня. Облучение всего тела проводилось на установке «ИГУР-1» в дозе 5 Гр. Процедуру прививки опухоли проводили за 7 суток до гамма-облучения

Опыт на модели перевиваемой аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛу мышей BALB/c

Опыты проведены на 105 мышах-самцах BALB/c массой 25-30 грамм (питомник лабораторных животных «Рапполово», Россия). Животных распределили на 6 групп. Использовали группу интактного контроля (n=5), и 5

групп с привитой опухолью АКАТОЛ (n=20 в каждой): АКАТОЛ без облучения, АКАТОЛ + Облучение, АКАТОЛ + ВР-С2 без облучения, АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 в лечебном режиме применения и АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 в лечебно-профилактическом режиме применения. Включение мышей в группу проводили при объеме опухолевого узла 0,1-0,5 см³, этот день принимали за нулевой.

ВР-С2 вводили в дозе 90 мг/кг интрагастрально зондом в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела. В лечебно-профилактическом режиме композиция вводилась перорально за 7 суток до облучения и далее ежедневно до конца опыта. В лечебном режиме введение осуществляли, начиная через 24 часа после облучения, ежедневно до конца эксперимента.

Локальное облучение опухоли проводили на нулевые сутки протонами с энергией 1000 МэВ стереотаксическим методом, поглощённая доза 10 Гр.

2.8.5. Исследования эффективности и безопасности ВР-С3 в опытах на мышах

2.8.5.1. Определение эффективной дозы композиции ВР-С3 на модели миелодепрессии, вызванной циклофосфамидом

Опыты проведены на 50 мышах самцах SHR, разделённых на пять групп по 10 животных: 1) контроль без введения циклофосфамида, 2) контроль с введением циклофосфамида (300 мг/кг, внутривентриально на 0 сутки), 3) ВР-С3 доза 1 (15 мг/кг, с -6 по 10 сутки опыта, ежедневно интрагастрально зондом в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела) + циклофосфамид (300 мг/кг, внутривентриально на 0 сутки), 4) ВР-С3 доза 2 (75 мг/кг, с -6 по 10 сутки опыта, ежедневно интрагастрально) + циклофосфамид (300 мг/кг, внутривентриально на 0 сутки), 5) ВР-С3 доза 3 (150 мг/кг, с -6 по 10 сутки опыта, ежедневно интрагастрально) + циклофосфамид (300

мг/кг, внутривенно на 0 сутки), 10 животных. В контрольных группах вводили плацебо в том же режиме и объеме, что и ВР-СЗ.

В качестве источника циклофосфамида использовали препарат Эндоксан 200 мг (Baxter Oncology GmbH, Германия), который разводили *ex tempore* стерильным физиологическим раствором 0,9% натрия хлорида.

До начала опыта, на –6 день, животные были рандомизированы по показателю содержания лейкоцитов в крови; из опыта выводились животные, индивидуальные показатели которых отклонялись от средних значений более чем на 3σ. В течение опыта за животными вели клиническое наблюдение. Масса тела животных определялась на –6, 4, 7, 11 сутки. Оценивали потребление корма и жидкости, выполняли клинический анализ крови и определяли клеточность костного мозга.

2.8.5.2. Углубленное исследование эффективной дозы композиции ВР-СЗ

На моделях миелодепрессии, вызванной 5-фторурацилом (5-ФУ), и лейкопении, вызванной циклофосфамидом, проведены опыты на 70 мышах-самцах SHR разделенных на группы по 10 особей: 1) контроль (без введения цитостатиков); 2) 5-ФУ (150 мг/кг, внутривенно, однократно на 0 сутки); 3) ВР-СЗ (ежедневно с -6 по 10 сутки опыта интрагастрально зондом в объеме 0,1 мл на 10 г массы тела в дозе 75 мг/кг) + 5-ФУ (150 мг/кг, внутривенно на 0 сутки); 4) циклофосфамид (300 мг/кг, внутривенно на 0 сутки); 5) ВР-СЗ (75 мг/кг, с -6 по 10 сутки опыта, ежедневно интрагастрально) + циклофосфамид (300 мг/кг, внутривенно на 0 сутки); 6) группа препарата сравнения - филграстин (20 мг/кг, подкожно, через 24 часа после введения циклофосфамида) + циклофосфамид (300 мг/кг, внутривенно на 0 сутки) и 7) ВР-СЗ (75 мг/кг, с -6 по 10 сутки опыта, ежедневно интрагастрально). В контрольных группах вводили плацебо в том же режиме и объеме, что и ВР-СЗ.

До начала опыта, на (-6) день, животные были рандомизированы по показателям содержания лейкоцитов (WBC) в крови; из опыта выводились животные, индивидуальные показатели которых отклонялись от средних значений более чем на 3σ .

Использовали 5-ФУ Ebewe (Sandoz International GmbH, Хольцкирхен, Германия) концентрат для приготовления раствора для инфузий (50 мг/мл), который разводили *ex tempore* стерильным физиологическим раствором 0,9% натрия хлорида. эксперимент. Доза 5-ФУ выбранная для исследования, вызывает анемию у мышей [326] и соответствует уровню доз у онкологических больных; например, 500 мг/м^2 в режиме CAF (циклофосфамид, адриамицин и 5-ФУ) соответствует дозе 165 мг/кг для мышей. В качестве филграстима использовали препарат Лейкостим (ЗАО «Биокад», Россия).

2.8.5.3. Исследование влияния режима введения композиции ВР-С3 по лечебной и лечебно-профилактической схеме на модели 5-ФУ индуцированной миелосупрессии

Опыт проведен на 105 самцах мышей линии SHR. Животные были рандомизированно разделены на следующие группы (по 21 животному): 1) контроль, 2) 5-ФУ (150 мг/кг однократно внутривенно в день 0); 3) лечебно-профилактический режим ВР-С3 (80 мг/кг с -7 суток до введения цитостатика и до 11 суток интрагастрально зондом в объеме $0,1 \text{ мл}$ на 10 г массы тела) + 5-ФУ (150 мг/кг внутривенно в день 0); 4) лечебный режим ВР-С3 (80 мг/кг с 1 суток после введения цитостатика и до 19 суток интрагастрально зондом в объеме $0,1 \text{ мл}$ на 10 г массы тела) + 5-ФУ; 5) контроль с ВР-С3 80 мг/кг интрагастрально зондом с -7 суток до 11 суток опыта. В контрольной группе вводили плацебо ежедневно интрагастрально зондом с -7 суток до 11 суток опыта.

Использовали 5-ФУ Ebewe (Sandoz International GmbH, Хольцкирхен, Германия) концентрат для приготовления раствора для инфузий (50 мг/мл),

который разводили *ex tempore* стерильным физиологическим раствором 0,9% натрия хлорида.

Проводили клинический анализ крови животных на 0 сутки до введения 5-ФУ и на 4, 7, 11, 17 и 20 сутки опыта. Для оценки клеточности костного мозга часть животных подвергали эвтаназии на 4, 11 и 20 сутки, выполняли аутопсию животных и рассчитывали органо-весовые коэффициенты для оценки органоспецифических токсических эффектов. У мышей, подвергнутых эвтаназии на 4-й день опыта, оценивали морфологию крипт в тощей кишке.

2.8.5.4. Исследование влияния ВР-С3 на эффективность химиотерапевтического лечения на модели бенз(а)пирен индуцированных аутохтонных сарком мягких тканей у мышей SHR

У мышей SHR индуцировали развитие сарком мягких тканей введением бенз(а)пирена. Через 15 недель животных, у которых развились опухоли диаметром приблизительно 5 мм, отбирали и рандомизировали в одну из четырех разделенных по полу исследовательских групп (день –1) и на 0 день опыта вводили циклофосфамид (ЦФ), ВР-С3 или плацебо вводили с 1 суток опыта ежедневно в течение 21 дня. Контрольным животным (10 самцов, 11 самок) делали внутрибрюшинную инъекцию 0,9% раствора хлорида натрия на 0 день и вводили плацебо через желудочный зонд. Животным в группе 2 (9 самцов, 10 самок) вводили ЦФ (200 мг/кг однократно внутрибрюшинно) и далее интрагастрально плацебо. В группе 3 (10 самцов, 11 самок) животным выполняли инъекцию 0,9% раствора хлорида натрия и вводили ВР-С3 (75 мг / кг ежедневно через желудочный зонд). Группа 4 (10 самцов, 11 самок) получала инъекцию ЦФ и курс ВР-С3. Исследование было завершено на 21 день. Оценивали динамику массы тела, динамику роста опухоли, клинический анализ крови. Образцы опухолей на 21 сутки животных фиксировали в 10% формалине и использовали для гистологического и иммуногистохимического анализа.

В качестве циклофосфамида использовали препарат Эндоксан 200 мг (серия 6E116A, Baxter Oncology GmbH, Германия), который разводили ex tempore стерильным физиологическим раствором 0,9% натрия хлорида.

Во втором опыте исследовали влияние ВР-С3 на субпопуляции лимфоцитов периферической крови у мышей без опухолей после введения ЦФ методом проточной цитометрии. 40 мышей самцов SHR были разделены на 4 группы: 1) Контроль (N=10), животным выполняли инъекцию 0,9% раствора хлорида натрия и вводили ежедневно плацебо через желудочный зонд; 2) ЦФ 300 мг/кг массы тела внутривенно (N=10) и введение плацебо; 3) ВР-С3 75 мг/кг массы тела ежедневно через желудочный зонд (N=10) и 4) ЦФ 300 мг/кг массы тела внутривенно + ВР-С3 75 мг/кг массы тела (N=10).

Оценка субпопуляций лимфоцитов в периферической крови мышей осуществлялась на 4 и 11 сутки после введения циклофосфамида, так как в эти сроки наблюдается nadir уровня лейкоцитов и затем восстановление их уровня.

Использовали антитела к антигену CD45 мыши (меченые APC-Cy7), кат. №557659, BD Bioscience, США, антитела к антигену CD19 мыши (меченые FITC), кат. №557398, BD Bioscience, США, антитела к антигену CD4 мыши (меченые PE-Cy5), кат. №553050, BD Bioscience, США, антитела к антигену CD3e мыши (меченые APC), кат. №553066, BD Bioscience, США, антитела к антигену CD8a мыши (меченые PE-Cy7), кат. №552877, BD Bioscience, США, антитела к антигену CD49b мыши (меченые PE), кат. №5295782, BD Bioscience, США. Раствор моноклональных антител, меченых флюорохромом, (по 5 мкл каждого антитела) помещали в пробирку для цитофлюориметрического анализа (12x75 мм). Добавляли 100 мкл периферической крови мыши, перемешали при помощи вихревого встряхивателя 1-3 секунды. Для лизирования эритроцитов добавляли лизирующий раствор FACS Lysing solution ($\times 10$) предварительно разведенный добавлением 9 объемов дистиллированной воды к одному объему маточного раствора. Осуществляли подготовку в приборе BD FACS Lyse /Wash Assistant, с программой «Complete protocol», которая включает: инкубацию образцов в течение 20 минут, лизирование эритроцитов при помощи добавления 1 мл рабочего

раствора FACS Lysing Solution в каждую пробирку, отмывку проб раствором для разбавления клеточной суспензии CellWASH. Затем проводили исследование субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток периферической крови мышей на проточном цитофлюориметре (BD FACS Canto™ II, BD Biosciences, США, программное обеспечение BD FACS Diva v8.0.1): оценивали относительное количество лимфоцитов, Т-лимфоцитов, В- лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, НК-клеток и НКТ-клеток, значение иммунорегуляторного индекса. Для подсчета абсолютного количества иммунокомпетентных клеток была применена двухплатформенная система анализа, расчет производился с использованием результатов гематологического анализатора. Результат выражали как процентное соотношение популяций от лимфоцитов, абсолютное значение как количество клеток в $10^9/л$.

2.8.5.5. Исследование влияния ВР-СЗ на эффективность химиотерапевтического лечения на модели спонтанных опухолей молочной железы у мышей самок линии FVB, трансгенных по HER-2/neu

Опыт проведен на 47 мышах самках линии FVB, трансгенных по HER-2/neu возрастом 7 месяцев с несколькими опухолями молочных желез на мышь средним объемом около 500 мм^3 . Животные были распределены на 8 групп (Таблица 4). Исследование проведено на животных со сформировавшимися опухолями, средним объемом около $0,5 \text{ см}^3$. Срок наблюдения за животными составил 21 сутки. Оценивали динамику роста опухоли, массу тела, гематологические показатели.

Таблица 4 – Распределение мышей линии FVB, трансгенных по HER-2/neu, с опухолями молочных желез в опытные группы.

Группа	Число животных	Дозы и режим введения препаратов
1 Контроль	5	Инъекция 0,9% раствора NaCl в/б на 0 сутки. Плацебо – в/ж с -6 по 21 сутки
2 Гемцитабин + Цисплатин	6	Гемцитабин –300 мг/кг в/б на 0 сутки Цисплатин – 3 мг/кг в/б на 0 сутки
3 САФ (циклофосфамид, адриамицин, 5- фторурацил)	6	Циклофосфамид – 165 мг/кг в/б на 0 сутки адриамицин – 8 мг/кг в/б на 0 сутки [#] 5-ФУ – 100 мг/кг в/в на 0 сутки [#]
4 Гемцитабин	6	Гемцитабин –300 мг/кг сутки
5 ВР-С3+САФ	6*	ВР-С3 – 75 мг/кг в/ж с -6 по 21 сутки Циклофосфамид – 165 мг/кг в/б на 0 сутки адриамицин – 8 мг/кг в/б на 0 сутки [#] 5-ФУ – 100 мг/кг в/в на 0 сутки [#]
6 ВР-С3+Гемцитабин	6*	ВР-С3 – 75 мг/кг в/ж с -6 по 21 сутки Гемцитабин –300 мг/кг сутки
7 ВР-С3+Гемцитабин + Цисплатин	6	ВР-С3 – 75 мг/кг в/ж с -6 по 21 сутки Гемцитабин –300 мг/кг в/б на 0 сутки Цисплатин – 3 мг/кг в/б на 0 сутки
8 ВР-С3	6*	ВР-С3 – 75 мг/кг в/ж с -6 по 21 сутки
<p>Примечания</p> <p>1 * – две мыши из группы 5, одна мышь из группы 6 и одна мышь из группы 8 были выведены из эксперимента в состоянии крайней тяжести и были исключены из анализа.</p> <p>2 [#] – расчетная доза (при пересчете доз с человека на мышь) была снижена в два раза в связи с развитием гепато- и энтеротоксичности в опытах по подбору доз.</p> <p>3 Пути введения: в/ж – внутрижелудочный, в/в – внутривенный, в/б – внутрибрюшинный.</p>		

2.8.6. Оценка безопасности длительного применения ВР-СЗ

В опыте были использованы 120 аутбредных мышей-самок SHR (питомник лабораторных животных «Рапполово», Россия), средней массой 27 г, возрастом 3 месяца. Мыши-самки SHR были выбраны для эксперимента в связи с тем, что они характеризуются умеренным спонтанным канцерогенезом и хорошей выживаемостью, что важно для оценки отдаленных эффектов препаратов в хронических опытах.

Композиция ВР-СЗ (ООО «Нобель», Россия [3]) была предоставлена в виде порошка. Навеску ВР-СЗ 1 г растворяли в 200 мл дистиллированной воды, добавляли 0,5 мл 30% аммиака и выдерживали при 50 °С, в течение 15 мин. Полученный водный раствор затем разбавляли в 100-200 раз питьевой водой для получения 0,005-0,01% раствора, который давали животным вместо питьевой воды. Концентрацию раствора ВР-СЗ в питьевой воде варьировали в зависимости от показателей массы тела животных и уровня потребления жидкости, для обеспечения дозы 10 мг/кг/сутки массы тела мышей (среднемесячная кумулятивная доза 300 мг/кг).

Животные были рандомизированы по весу на две группы – контрольную и подопытную; в каждую группу включено 60 мышей. Животные первой группы служили интактным контролем, животные группы 2 постоянно получали ВР-СЗ. На протяжении всего опыта проводили ежедневное наблюдение за животными с целью оценки их состояния и раннего выявления опухолей, в основном, новообразований молочной железы, которые наиболее характерны для самок данной линии мышей [59]. Срок появления, локализацию и размер опухолей регистрировали в лабораторном журнале. Ежемесячно мышей взвешивали, и в те же сроки оценивали потребление корма (г/день/мышь) и жидкости (мл/день/мышь). Для измерения индивидуального потребления корма и жидкости в пустой контейнер для корма и автопоилку помещали корм (10 г/мышь) и питьевую воду (10 мл/мышь), соответственно, через 24 часа определяли количество оставшихся корма и жидкости, которые вычитали из исходного их количества и полученную

разницу делили на количество животных в клетке [66]. Каждые 3 месяца (с возраста 3 месяца непосредственно перед началом эксперимента и далее) у животных анализировали эстральный цикл, подвергая цитологическому исследованию содержимое влагалищных мазков (ежедневно на протяжении 2 недель) [20]. Изучали продолжительность эстрального цикла и его фаз, относительную частоту эстральных циклов различной продолжительности, частоту регулярных и иррегулярных циклов. В этот же период проводили измерение ректальной температуры с помощью электротермометра ТПЭМ-1 (завод медицинской аппаратуры НПО «Медфизприбор», г. Казань, Россия). За животными наблюдали до их естественной гибели. Даты гибели регистрировались для каждого животного, затем рассчитывали среднюю продолжительность жизни всех животных и 10% последних выживших мышей. Всех павших и подвергнутых эвтаназии животных подвергали патоморфологическому исследованию.

3. Результаты исследования

3.1. Исследование молекулярных мишеней действия и фармакокинетики полифенольной основы композиций ВР-С2 и ВР-С3

3.1.1. Исследование потенциальных молекулярных мишеней действия ВР-Сх-1 *in vitro* на панели Diversity Profile P9

Проведено исследование селективности ВР-Сх-1 на панели 97 ферментов и рецепторов, которые наиболее часто являются причинами нежелательных явлений лекарственных препаратов [101]. Показано, что в концентрации 0,0042% (V/V) (максимально возможной для тестирования исходя из концентрации готового раствора) ВР-Сх-1 существенно (ингибирование >50%) взаимодействует с 24 мишенями (Таблица 5). Большинство из идентифицированных мишеней относятся к рецепторам нейротрансмиттеров, лиганд-управляемым ионным каналам и транспортерам, которые имеются в центральной и периферической нервной системе. Учитывая, что композиции, содержащие лиганд ВР-Сх-1, разрабатываются в качестве поддерживающей терапии больных раком [68], особый интерес представляло выявить молекулярные мишени, которые участвуют в модуляции воспаления и иммунного ответа. Аденозиновые, адренергические, брадикининовые рецепторы, глюкокортикоидный рецептор, гистаминовые рецепторы, ацетилхолиновые мускариновые рецепторы, пуринергические рецепторы и простагландин рецепторы, как известно, участвуют в регуляции воспалительного ответа [161]. Ингибирование рецептора брадикинина В1 [116, 317], мускариновых рецепторов М1 и М2 [255], гистаминового рецептора Н1 [325] и простагландин рецепторов EP2 [148], а также активация глюкокортикоидного рецептора GR [173] и аденозиновых рецепторов А (1), А (2А) [54, 92] полезны для снижения воспаления и болевого синдрома. Есть сведения, свидетельствующие о том, что хроническое воспаление тесно связано с раком [126, 298].

Таблица 5 – Мишени взаимодействия для ВР-Сх-1, определенные на панели Diversity Profile P9

Семейство рецепторов	Мишень	Символьное обозначение белка/семейства белков	Степень ингибирования, %
Аденозиновые рецепторы	A1 (h)	ADORA1	62,1
	A2A (h)	ADORA2A	86,6
	$\alpha 2$	ADORA2A-C	52,2
Адренергические рецепторы	$\beta 1$ (h)	ADRB1	51,5
	$\beta 2$ (h)	ADRB2	71,4
Рецептор γ -аминомасляной кислоты (ГАМК _A)	BZD	GABRA1	53,8
Глутаматные рецепторы	AMPA	GRIA 1-4	90,9
	Kainate	GRIK 1-5	84,3
Брадикининовые рецепторы	B1 (h)	BDKRB1	76,7
Дофаминовые рецепторы	D4.4 (h)	DRD4	62,7
Гистаминовые рецепторы	H1 (h)	HRH1	57,6
Холинергические рецепторы	$\alpha 4\beta 2$ (h)	CHRNA2, CHRNB4	73,5
	M	CHRM1-5	96,3
Вазопрессиновые рецепторы	V2 (h)	AVPR2	69,8
	V1a (h)	AVPR1A	56,4
Ионные каналы	KATP	KCNJ	50,3
Транспортеры	GABA	SLC6A1	71,5
Рецептор к тиреоид-стимулирующему гормону	TRH1 (h)	TSHR	68,8
Глюкокортикоидный рецептор	GR (h)	NR3C1	63,2
Серотониновый рецептор	5-HT1	HTR1 A,B,D,E,F	81
Пуринергические рецепторы	P2X	P2RX1-7	64
	P2Y	P2RY1,2,4,6,11-14	52,6
Простаноидные рецепторы	EP2 (h)	PTGER2	52,4
	IP (PGI ₂)	PTGIR	68,7

Это может указывать на особую роль рецепторов, промотирующих воспаление в онкогенезе. Опухоли продуцируют множественные паракринные, аутокринные и системные сигнальные факторы для поддержания высокого уровня пролиферативной активности и метаболизма и для предотвращения иммунного ответа со стороны организма. Поэтому одновременное воздействие на несколько мишеней потенциально может быть полезным для больных раком.

3.1.2. Моделирование активности полифенольного лиганда композиций ВР-С2, ВР-С3 *in silico*

Для полученных при химическом анализе состава методом МС ИЦРПФ брутто-формул для 2146 одно- и 1602 двухзарядных ионов в составе ВР-Сх-1 осуществлен поиск в базе ChEMBL (база данных ChEMBL ver. 22, <https://www.ebi.ac.uk/chembl>) всех возможных структурных формул, соответствующих брутто-формулам. Проведено отсеивание фрагментов структур, которые не были обнаружены при анализе методами ЯМР, которые были выполнены на базе МГУ имени М.В. Ломоносова. Для оставшихся (около 27 000) структур осуществлялся поиск записей о биологической активности в ChEMBL [143]. Соответствующие структуры были извлечены вместе с данными по их биологической активности. Всего удалось извлечь 1474 соответствующих анализов, которые соответствуют 1316 соединениям базы ChEMBL с интерпретируемыми данными активности. Было проведено сопоставление активности этих соединений с активностью Вр-Сх-1, полученной ранее на панели Diversity Profile – Р9 (Таблица 5). Затем были построены структурные схемы (скаффолды) веществ, активность которых сопоставима с биологической активностью ВР-Сх-1 и веществ, идентифицированных в базе ChEMBL.

Скаффолды подобранных соединений соответствуют производным фурандитерпенов, тетрациклическим тритерпенам и их предшественникам –

фенантреновым структурам, а также таким соединениям, как флавоноиды и простые ароматические соединения. Соединения этих типов входят в состав различных природных продуктов [172, 213, 299], и они также могут образовываться в ходе последовательного кислотного и щелочного гидролиза древесины [57].

Анализ молекулярного состава ВР-Сх-1 методом МС ИЦПФ и последующая идентификация возможных активных компонентов ВР-Сх-1 путем поиска их молекулярных формул *in silico* в базе ChEMBL указывают на то, что его биологическая активность композиций на его основе может быть обусловлена множеством содержащихся в нем полифенольных компонентов: флавоноиды, сапогенины, фенантрены и др. Скрининг мишеней *in vitro* и *in silico* дал не идентичные, но перекрывающиеся списки. Оба метода идентифицировали в качестве мишеней аденозиновые рецепторы A1 (ADORA1) и A2 (ADORA2A), дофаминовый рецептор D4.4 (DRD4), глюкокортикоидный рецептор GR (NR3C1), серотониновый рецептор 5-HT1 (HTR1A), рецепторы простагландина EP2 (PTGER2) и I2 (PTRIG), мускариновый холинергический рецептор CHRМ1 и рецептор ГАМК (GABRA1) [143].

3.1.3. Исследование распределения меченого [³H]-Вр-Сх-1 у мышей BALB/c

Мышам линии BALB/c внутривенно и перорально вводили меченый тритием полифенольный лиганд [³H]-Вр-Сх-1. Работы были выполнены на базе кафедры радиохимии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

На вскрытии у всех животных после внутривенного введения лиганда отмечалось коричневатое окрашивание тканей и внутренних органов, за исключением тимуса. Более выраженная окраска наблюдалась в легких. Вероятно, следует избегать внутривенного введения полифенольного лиганда или использовать более низкий уровень доз, что связано с развитием нарастающей

адинамии с признаками дыхательной недостаточности у животных. На вскрытии в легких также наблюдались точечные очаги кровоизлияний, что было связано со способом эвтаназии (цервикальная дислокация) и могло оказать влияние на результаты измерения. У животных через 60 минут после введения наблюдали окрашивание содержимого тонкого кишечника и слепой кишки в темно-коричневый цвет, максимально выраженное спустя 12 часов от введения лиганда, что могло указывать на его выведение через кишечник. Желчный пузырь имел обычную форму и окраску. Печень полнокровная. Прочих макроскопических изменений внутренних органов не наблюдалось.

Пероральное введение хорошо переносилось животными. На вскрытии мышей в случае перорального введения полифенольного лиганда через 24 после введения он наблюдался в просвете начального отдела толстого кишечника и в слепой кишке (Рисунок 4). Специфических макроскопических изменений внутренних органов не отмечали.



Рисунок 4 – Макрофотография мыши со вскрытой брюшной полостью через 24 часа после перорального введения $[^3\text{H}]$ -Вр-Сх-1. Стрелкой показаны отделы толстого кишечника с содержанием полифенольного лиганда в просвете

Следует отметить низкую концентрацию органического лиганда в крови после его внутривенного введения во всех временных точках, максимальная концентрация была зарегистрирована через 6 часов после введения (Таблица 6). Средняя концентрация лиганда в крови составила от 26 до 155 мкг/г крови, с T_{max} около 6 часов. После достижения максимальной концентрации, уровень содержания лиганда в крови снижается с $T_{1/2}$ около 6 часов (определено внемодельным расчетом, в связи с недостаточным количеством точек наблюдения после T_{max}). Площадь под кинетической кривой за 6 часов $AUC_{(0-6)} = 47204,7$ мкг×мин/г.

После перорального введения (Таблица 7) концентрация в крови была на один-два порядка ниже, чем при внутривенном введении и не зависела от времени определения. Средняя концентрация лиганда в крови составляла от 1,3 до 2,7 мкг/г с $T_{max} = 2$ часа и наблюдалось постепенное ее снижение с $T_{1/2}$ 22-24 часа. Площадь под кинетической кривой за 6 часов $AUC_{(0-6)} = 731,5$ мкг×мин/г.

Максимальное содержание органического лиганда после внутривенного введения (Таблица 6) было обнаружено в легких, где по расчетам задерживалось 30-40% вещества, что может быть связано с его агрегацией и задержкой в капиллярах, о чем свидетельствует интенсивное коричневое окрашивание легочной ткани при макроскопическом исследовании. При пероральном введении (Таблица 7) подобная картина не наблюдалась и содержание в легких было сопоставимо с другими органами.

При системном введении, органами преимущественного накопления являются легкие (2400–5000 мкг/г), печень, почки и селезенка (уровень концентраций 50-400 мкг/г). Тимус и яичники накапливают от 16 до 116 мкг/г, сердце и головной мозг – от 3,7 до 6,3 мкг/г.

Таблица 6 – Среднее содержание органического лиганда в органах после внутривенного введения дозы 100 мг/кг у самок мышей BALB/c (мкг/г ткани) в зависимости от времени после введения

Орган	Время после введения, мин					
	7	30	60	114	369	716
Легкие	2367±153	2367±115	4300±265	4867±503	3400±200	5000±854
Печень	397±45	367±31	230±104	253±55	220±44	170±20
Почки	233±51	207±15	180±173	343±170	227±58	293±57
Селезенка	233±91	153±15	80±44	73±15	47±15	57±15
Кровь	26±10	32±5	91±10	72±5	155±29	86±31
Тимус	24±5	16±1	28±2	24±6	26±3	27±12
Яичники	42±3	41±8	63±2	64±1	48±8	116±46
Сердце	5,4±0,7	5,3±2,0	3,9±1,4	5,3±0,8	4,2±1,1	4,2±1,6
Головной мозг	3,9±0,7	3,7±0,0	5,9±0,8	4,9±0,4	6,3±0,8	4,9±0,9
Примечание – Данные представлены в виде среднего значения и СКО.						

При пероральном введении концентрации в органах животных были на несколько порядков меньше – от 2,1 до 17,7 мкг/г в печени и почках, от 0,01 до 7,3 мкг/г в остальных органах, включая головной мозг.

Часть лиганда при внутривенном введении проникала в головной мозг, где его содержание не зависело от времени определения после введения. Содержание в головном мозге при внутривенном введении только в 2 раза превышало этот показатель при пероральном введении.

Таким образом, при пероральном введении органический лиганд характеризуется низкой абсолютной биодоступностью (около 1,5%, определено по соотношению AUC при внесистемном и системном введении).

Таблица 7 – Среднее содержание органического лиганда в органах после перорального введения дозы 100 мг/кг у самок мышей BALB/c (мкг/г ткани) в зависимости от времени после введения

Орган	Время после введения, мин					
	29	60	120	375	1440	2880
Печень	2,10±0,30	3,37±0,90	16,13±22,29	5,80±0,35	4,67±2,40	5,73±3,15
Почки	2,50±0,26	2,53±0,38	17,73±26,65	4,60±0,79	3,83±1,27	4,00±1,87
Головной мозг	2,10±0,17	1,93±0,42	1,30±0,56	1,73±0,40	1,07±0,45	0,97±0,38
Селезенка	1,97±0,21	2,00±0,36	4,33±5,53	1,87±0,42	1,27±0,55	1,20±0,61
Тимус	1,73±0,32	1,77±0,45	7,33±11,06	1,83±0,50	1,13±0,47	0,93±0,49
Кровь	1,50±0,17	1,63±0,45	2,70±3,21	1,87±0,29	1,33±0,70	1,33±0,59
Легкие	0,73±0,61	1,37±0,87	2,80±3,14	1,73±1,67	1,20±1,56	0,70±0,53
Яичники	0,47±0,55	0,58±0,32	1,03±1,44	1,17±0,21	0,53±0,40	0,77±0,38
Сердце	0,008±0,004	0,045±0,043	0,16±0,251	0,077±0,047	0,041±0,039	0,06±0,04
Примечание – Данные представлены в виде среднего значения и СКО.						

3.1.4. Исследование фармакокинетики ВР-С2 при многократном введении у крыс, оценка накопления молибдена в органах и кумулятивной токсичности ВР-С2

Фармакокинетика и токсичность композиции ВР-С2 изучалась по схеме введения повышающейся дозы по молибдену. 24 крысам-самкам линии Вистар (6 животных в группе) перорально вводили изучаемые соединения в течение 2-х курсов по 2 недели с перерывом в 2 недели. Животные получили кумулятивную дозу ВР-С2 4200 мг/кг (в дозе 100 мг/кг в течение 2 недель, общая доза 1400 мг/кг, перерыв 2 недели, затем в дозе 200 мг/кг в течение двух недель, общая доза 2800 мг/кг (Рисунок 5)), осуществляли введение молибдата аммония (дозы 25 или 50

мг/кг для первого и второго курса, соответственно, (Рисунок 5)) и лиганда ВР-Сх-1 (дозы 75 или 150 мг/кг). Контрольные животные получали 0,9% NaCl в том же режиме и объеме. Содержание молибдена в крови контрольной группы и группы животных, получавших ВР-Сх-1, не превышало 40 мкг/л.

При введении суточной дозы ВР-С2 100 мг/кг стационарная концентрация (около 1000 мкг Мо/л крови) устанавливалась на 10-12 день. Для второго курса введения дозы ВР-С2 200 мг/кг в сутки, наблюдалось увеличение как равновесной концентрации Мо (около 4000 мкг Мо/л с остаточным уровнем от первого курса около 300 мкг Мо/л) так и времени ее достижения (12-13 дней) (Рисунок 5). Кинетика элиминации молибдена описывается с помощью двухкомпарментной модели ($t_{1/2\beta 1} \approx 7$ дней, $t_{1/2\beta 2} \approx 9$ дней). Отсутствие стационарной концентрации и дозовой зависимости при введении более высокой дозы позволяет предположить появление изменений в пути элиминации молибдена.

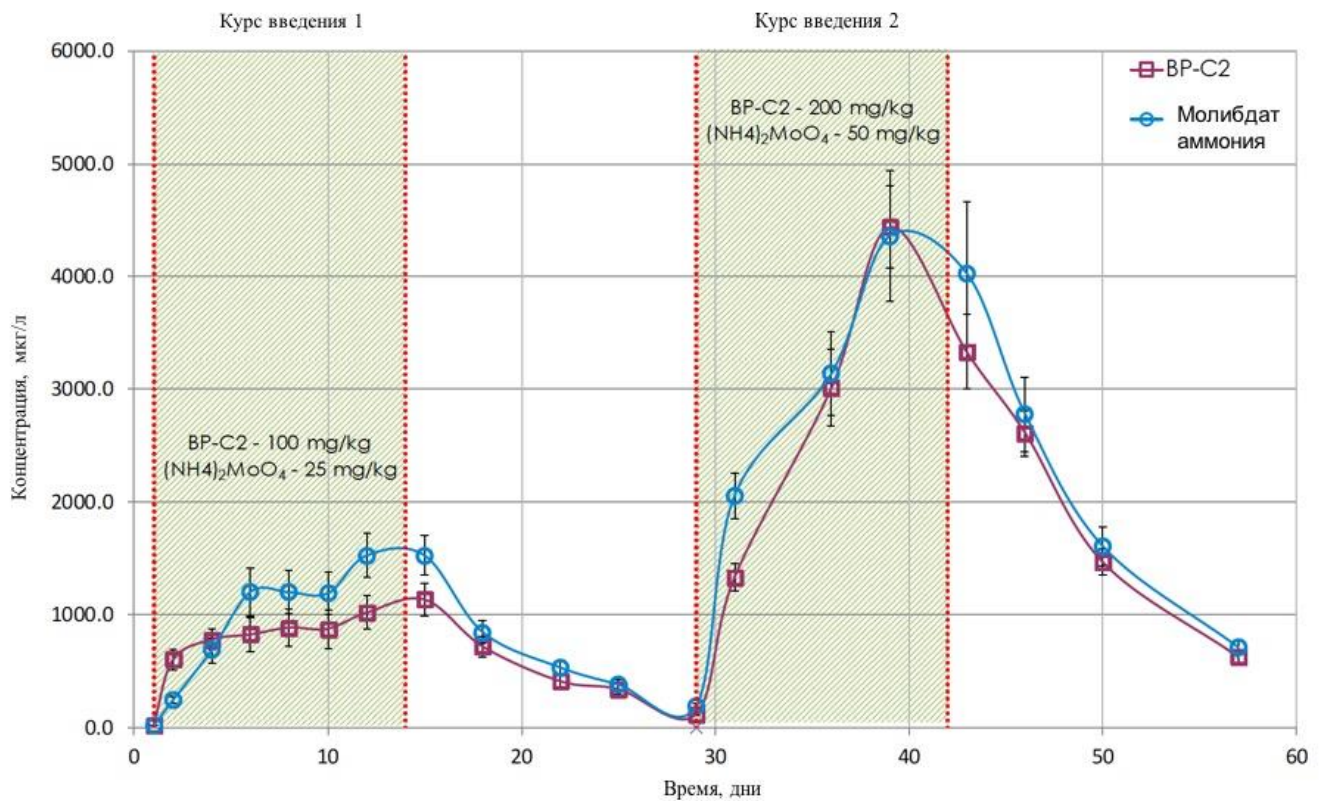


Рисунок 5 – Фармакокинетические кривые курсового введения ВР-С2 и молибдата аммония у крыс-самок линии Вистар

Картина распределения Мо в группе ВР-С2 и $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ была сходной (Таблица 8). Почки были целевым органом накопления Мо. Низкие концентрации Мо были обнаружены в мозге и печени, но значительные количества Мо были обнаружены в яичниках и мышцах по сравнению с контрольной группой.

Субхроническое воздействие повышенных доз ВР-С2 и достигнутые высокие концентрации молибдена в крови животных не были ассоциированы с выраженной токсичностью, что подтверждает высокую безопасность композиции ВР-С2 при введении курсами по 2 недели.

Таблица 8 – Содержание Мо в органах (мкг/кг) в конце двух курсов перорального введения ВР-С2 в разных группах у крыс-самок линии Вистар

Орган	Контроль	ВР-Сх-1	ВР-С2	$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$
Яичники	61 ± 9 (3,2)	48 ± 25 (3,5)	2170 ± 95 *** (3,4)	2144 ± 74 *** (3,0)
Головной мозг	42 ± 3 (2,2)	37 ± 1 (2,7)	73 ± 9 ** (0,1)	76 ± 4 *** (0,1)
Скелетная мышца	5 ± 0 (0,3)	6 ± 3 (0,5)	226 ± 95 * (0,4)	228 ± 74 * (0,3)
Сердце	45 ± 1 (2,4)	51 ± 1 (3,7)	587 ± 175 * (0,9)	571 ± 103 ** (0,8)
Кишечник	175 ± 2 (9)	187 ± 23 (13)	585 ± 172 * (0,9)	660 ± 158 * (0,9)
Почки	424 ± 31 (22)	420 ± 14 (30)	9788 ± 2272 ** (15)	10792 ± 2690 ** (15)
Печень	1175 ± 66 (63)	1248 ± 66 (91)	2067 ± 395 * (3,3)	1729 ± 246 * (2,4)

Примечания

1 Статистически значимые отличия от контрольной группы: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,02$, *** – $p < 0,01$ ($n=3$ в каждой группе).

2 В скобках указано отношении концентрации в органе к концентрации в крови.

Содержание эритроцитов и лейкоцитов в крови крыс после окончания 2-го курсов введения ВР-С2 или молибдата аммония статистически значимо не отличалось от показателя контрольной группы (Таблица 9).

Таблица 9 – Показатели клинического анализа крови разных групп крыс-самок линии Вистар в конце второго курса перорального введения ВР-С2

Показатель	Контроль	ВР-Сх-1	ВР-С2	(NH ₄) ₂ MoO ₄
Эритроциты, ×10 ¹² /л	8,8±0,3	8,1±0,3	8,6±0,1	8,9±0,1
Гематокрит, %	48,8±1,5	46,7±1,2	49,8±1,2	49,2±0,8
Гемоглобин, г/л	149,0±5,1	140,8±3,8	150,7±3,6	149,2±2,8
Средний объем эритроцита, фл	55,8±0,6	57,5±1	57,7±1,6	55,6±0,7
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	17±0,2	17,3±0,3	17,4±0,4	16,8±0,2
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	13,8±3,7	9,4±2,8	13,3±1,2	12,4±4,1
Лимфоциты, ×10 ⁹ /л	8,4±2,1	6,4±2,3	8,4±0,8	8,1±3,4
Гранулоциты, ×10 ⁹ /л	4,8±1,6	2,7±0,5	4,4±0,5	3,9±0,8
Моноциты, ×10 ⁹ /л	0,6±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1	0,5±0,2
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	688±144	875±42	860±36	861±62
Примечание – n=6 в каждой группе.				

Результаты биохимического анализа крови после последнего введения на 42 сутки приведены в таблице (Таблица 10). Из всех изученных показателей у крыс, получавших ВР-С2, наблюдалось увеличение активности только лактатдегидрогеназы.

При гистологическом исследовании печени и почек структурных отличий ткани органов между опытной и контрольной группой животных выявлено не было.

Таким образом, ВР-С2 имеет относительно короткий период полувыведения из крови ($t_{1/2} \approx 7$ дней) и тканей. При дозе 100 мг/кг стационарная концентрация ВР-С2 в крови достигается через 4 дня. При субхроническом воздействии повышенных доз ВР-С2 и высокого уровня Мо в крови признаков токсичности при вскрытии, гистологическом исследовании или клиническом и биохимическом анализах крови не наблюдалось, что свидетельствует о безопасности курсового введения ВР-С2.

Следует отметить, что ранее проведенные нами исследования с Pt-содержащим препаратом, разработанным для лечения больных с метастатическим раком молочной железы, показали высокую безопасность этого препарата. Это связано со способностью полифенольного лиганда ВР-Сх-1 менять фармакокинетику цисплатина [312], при сохранении его противоопухолевой активности и уменьшении системной токсичности [251].

Таблица 10 – Показатели биохимического анализа крови разных групп крыс-самок линии Вистар в конце второго курса перорального введения ВР-С2

Показатель	Контроль	ВР-Сх-1	ВР-С2	(NH ₄) ₂ MoO ₄
Альбумин, г/л	41,6±1,3	35,2±8,7	39,9±3,5	45,3±5,0
АЛТ, Ед/л	259,8±40,8	191,4±40,9	196,7±43,2	280,5±56,6
АСТ, Ед/л	333,7±144,5	179,7±14,3	217,6±17,1	436,6±166,3
Гамма- глутамилтрансфераза, Ед/л	9,61±3,43	5,71±0,53	4,13±1,74	4,75±0,97
Лактатдегидрогеназа, Ед/л	821±300	760±225	2372±235 * #	1996±655
Щелочная фосфатаза, Ед/л	333,2±69,5	238,5±29,1	316,6±44,9	274,6±35,4
Креатинин, мкмоль/л	35,26±8,91	34,83±12,59	35,38±12,87	36,96±6,22
Амилаза, Ед/л	1204±118	1170±246	1165±64	1274±150
Глюкоза, ммоль/л	5,16±0,64	5,36±0,67	5,85±0,12	5,21±0,47
Кальций, ммоль/л	6,30±0,17	5,91±0,74	5,84±0,32	6,15±0,20
Мочевая кислота, мкмоль/л	101,9±22,8	92,8±12,8	135,6±29,1	124,2±9,0
Мочевина, ммоль/л	7,16±0,49	6,10±1,25	6,77±0,94	6,13±0,73
Фосфор, ммоль/л	1,41±0,41	1,29±0,13	1,38±0,11	1,23±0,06
Триглицериды, ммоль/л	0,96±0,20	1,40±0,83	2,08±0,97	1,33±0,49
Холестерин, ммоль/л	2,30±0,19	1,69±0,48	1,84±0,34	1,85±0,49
Примечание – Статистически значимые отличия: * – p<0,05 от контрольной группы, # – p<0,05 от группы ВР-Сх-1 (n=3 в каждой группе).				

3.2. Экспериментальные исследования радиозащитной эффективности композиции полифенольного производного лигнина с молибдатом аммония – ВР-С2 – у крыс и мышей

Экспериментальные исследования радиозащитной эффективности ВР-С2 были проведены на общепринятых моделях острого радиационного поражения всего тела у грызунов (крысы и мыши) с установлением механизма действия, а также была проведена оценка влияния на противоопухолевую эффективность лучевого воздействия на моделях опухолевого роста у крыс и мышей.

3.2.1. Оценка противолучевых свойств композиции ВР-С2 на крысах-самцах линии Вистар при общем равномерном облучении

Опыты показали, что композиция ВР-С2 при однократном внутрижелудочном введении хорошо переносится и существенным образом не оказывает влияния на общее состояние и поведение крыс. Величины летальных доз (ЛД) ВР-С2 составляют: ЛД₁₀ — $2,9 \pm 0,6$ г/кг; ЛД₅₀ — $5,6 \pm 0,7$ г/кг; ЛД₉₉ — $8,7 \pm 0,6$ г/кг, что позволяет отнести ее к классу малоопасных веществ (по ГОСТ 12.1.007-76). Так как при оценке противолучевой эффективности ВР-С2 предполагалось его десятикратное введение было принято решение испытывать дозы 1/30; 1/60 и 1/1000 от ЛД₁₀.

Результаты экспериментов по оценке противолучевых свойств ВР-С2 представлены ниже (Таблица 11). Композиция оказывает выраженное противолучевое действие при остром радиационном поражении в диапазоне среднелетальных доз (4–6 Гр). Прослеживается дозозависимое противолучевое действие ВР-С2, так как с увеличением вводимой дозы композиции наблюдали усиление противолучевого эффекта. Наилучший эффект отмечали при введении ВР-С2 в дозе 93,7 мг/кг. При применении композиции в этой дозе у крыс,

облученных гамма-квантами в дозе 4,0 Гр, выживаемость увеличивалась на 25 %, а величина СПЖ более чем на 4 суток. При облучении в дозе 5,0 Гр выживаемость увеличивалась на 41,7 %, а величина СПЖ на 6,1 суток. Защитное действие композиции выявлено и при облучении крыс в дозе 6,0 Гр. При этом выживаемость животных увеличилась на 50 %, а величина СПЖ на 8,4 суток.

Таблица 11 – Показатели выживаемости облученных в разных дозах крыс контрольной группы и получавших внутрижелудочно ВР-С2

Доза облучения	Группа	Число выживших / общее число животных в группе	Выживаемость к 30 суткам, %	СПЖ, сут
4 Гр	Контроль	9 / 12	75,0	25,3 ± 2,5
	ВР-С2 3,0 мг/кг	10 / 12	83,3	26,8 ± 2,1
	ВР-С2 48,5 мг/кг	10 / 12	83,3	26,8 ± 2,1
	ВР-С2 93,7 мг/кг	12 / 12	100,0 *	> 30*
5 Гр	Контроль	6 / 12	50,0	22,4 ± 2,4
	ВР-С2 3,0 мг/кг	7 / 12	58,3	22,7 ± 2,6
	ВР-С2 48,5 мг/кг	8 / 12	66,7 *	23,7 ± 2,7
	ВР-С2 93,7 мг/кг	11 / 12	91,7 *	28,5 ± 1,5*
6 Гр	Контроль	3 / 12	25,0	18,0 ± 2,2
	ВР-С2 3,0 мг/кг	7 / 12	58,3 *	25,2 ± 1,8
	ВР-С2 48,5 мг/кг	5 / 12	41,7 *	22,0 ± 2,4
	ВР-С2 93,7 мг/кг	8 / 12	75,0 *	26,4 ± 1,9*
7 Гр	Контроль	0 / 12	0,0	13,7 ± 1,4
	ВР-С2 3,0 мг/кг	0 / 12	0,0	9,4 ± 1,5
	ВР-С2 48,5 мг/кг	0 / 12	0,0	8,8 ± 0,4
	ВР-С2 93,7 мг/кг	0 / 12	0,0	11,5 ± 1,2
8 Гр	Контроль	0 / 12	0,0	9,2 ± 0,5
	ВР-С2 3,0 мг/кг	0 / 12	0,0	8,7 ± 0,5
	ВР-С2 48,5 мг/кг	0 / 12	0,0	9,3 ± 0,6
	ВР-С2 93,7 мг/кг	0 / 12	0,0	8,8 ± 0,7
Примечание – * – $p < 0,05$ при сравнении с показателями контроля для каждой дозы облучения.				

Меньшие дозы ВР-С2 (3,0 и 48,5 мг/кг) также оказались эффективными. Противолучевое действие композиции, вводимой в дозе 48,5 мг/кг при облучении

в дозе 5,0 Гр, характеризовалось увеличением величины выживаемости на 16,7 %, также, как и в дозе 6,0 Гр — на 16,7 %. Достоверных различий по показателю СПЖ при этом не было. Эффективность ВР-С2 при многократном внутрижелудочном введении в дозе 3,0 мг/кг отмечена только при воздействии гамма-квантов в дозе 6,0 Гр. В этом случае выживаемость крыс увеличивалась на 33,3 %. Необходимо отметить, что на моделях тяжелой степени острого радиационного поражения введение композиции ВР-С2 в различных дозах оказалось неэффективным.

Проведенные эксперименты позволили рассчитать смертельные дозы облучения, приводящие к гибели крыс в контрольной и опытных группах, а также величину ФИД. Так, в группе «Контроль» величины $LD_{16/30}$; $LD_{50/30}$; $LD_{84/30}$ составляют 3,9; 5,0 и 6,0 Гр, соответственно. Значение аналогичных смертельных доз при пероральном введении ВР-С2 в дозе 93,7 мг/кг принимают значения 5,5; 6,1 и 6,7 Гр. Величина ФИД композиции по критерию выживаемости при гамма-облучении составила $6,1 / 5,0 = 1,2$, что показано на рисунке (Рисунок 6).

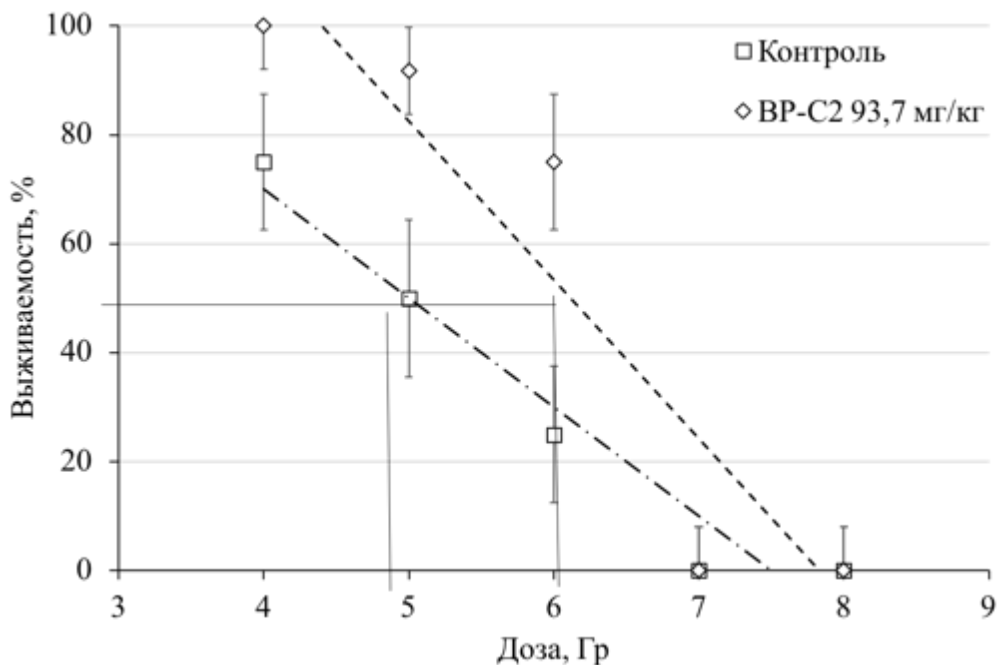


Рисунок 6 – Зависимость выживаемости крыс от дозы γ -облучения в опыте с 10-ти кратным пероральным введением композиции ВР-С2 ($n = 12$ в каждой группе)

Так как наибольшая противолучевая эффективность ВР-С2 была отмечена при облучении в диапазоне среднелетальных доз, дальнейшее изучение механизмов и особенностей противолучевого действия композиции проводили при облучении крыс в дозе 5,0 Гр. Данные о влиянии многократного внутрижелудочного введения ВР-С2 на характер изменений количества клеток «белой» крови облученных крыс приведены в таблице (Таблица 12).

У животных контрольной группы прослеживалось развитие «классических» признаков костномозговой формы острого радиационного поражения. Уже на 3 сутки после облучения у них развивалась выраженная лейко- и лимфоцитопения. На 10 сутки по сравнению с исходным уровнем абсолютное количество лимфоцитов падало почти в 10 раз, гранулоцитов – в 3 раза. К 21-м суткам у выживших крыс наблюдали восстановление гематологических показателей.

В периферической крови животных, которым вводили ВР-С2, к моменту начала облучения, через 9 суток после начала введения композиции, абсолютное количество лейкоцитов и лимфоцитов у животных этой подопытной группы было в 1,6 и 1,5 раза больше, соответственно, чем в контрольной группе. После облучения у крыс подопытной группы также развивалась костномозговая форма острого радиационного поражения. Выраженные лейко- и гранулоцитопения наблюдались на 3 сутки. К 21-м суткам основные гематологические показатели выживших животных подопытной группы соответствовали значениям физиологической нормы.

При изучении гемопоэза облученных крыс (Таблица 13) выявлено, что на 3-е сутки после облучения количество миелокариоцитов в костном мозге крыс, облученных в дозе 5 Гр уменьшилось в 7 раз по сравнению с исходным уровнем и составило $22,4 \times 10^9/\text{л}$. К 10-м суткам количество миелокариоцитов достоверно не изменялось, а в последующем наблюдали постепенное улучшение гемопоэза. Так, на 14-е сутки после облучения количество миелокариоцитов костного мозга составило уже $36,2 \times 10^9/\text{л}$.

Таблица 12 – Влияние внутрижелудочного введения ВР-С2 в дозе 93,7 мг/кг на количество клеток «белой» крови крыс, облученных в дозе 5 Гр

Группа	Срок наблюдения, сутки	Содержание в крови, $\times 10^9/\text{л}$			
		лейкоцитов	лимфоцитов	гранулоцитов	моноцитов
Биоконтроль	-	$8,5 \pm 2,7$	$5,0 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,7$	$1,0 \pm 0,2$
Облученный контроль	0	$8,7 \pm 1,3$	$5,1 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,2$
	3	$2,3 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,2$
	10	$1,7 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,0$
	14	$4,2 \pm 1,2$	$1,8 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,2$
	21	$14,1 \pm 7,2$	$8,8 \pm 6,7$	$4,0 \pm 1,2$	$1,4 \pm 0,3$
ВР-С2 + облучение	0	$14,2 \pm 2,0$	$7,7 \pm 1,0$	$4,9 \pm 1,4$	$1,6 \pm 0,2$
	3	$1,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
	10	$1,6 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
	14	$2,0 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,0$
	21	$14,1 \pm 7,2$	$8,8 \pm 6,7$	$3,8 \pm 1,1$	$1,5 \pm 0,4$

Введение ВР-С2 способствовало сохранению миелокариоцитов в костном мозге крыс. На 3 сутки их было в 1,3 раза больше, чем в контрольной группе, а к 14-м суткам в 2 раза больше. Кроме более раннего восстановления костномозгового кроветворения у облученных животных, которым внутрижелудочно вводили ВР-С2, количество миелокариоцитов на 10-е и 14-е сутки достоверно превышало показатели облученной контрольной группы и составило $28,8$ и $48,6 \times 10^9/\text{л}$, соответственно, однако оставалось ниже уровня аналогичного показателя в группе интактного биологического контроля.

Полученные нами данные о фармакологической активности композиции ВР-С2 согласуются с данными ранее проведенных исследований радиобиологических эффектов олипифата – одного из производных лигнина [17, 18], различных полифенольных соединений и их комплексов с металлами [7, 171]. Результаты экспериментов по оценке противолучевых свойств ВР-С2 свидетельствуют, что он

оказывает противолучевое воздействие при остром радиационном поражении в диапазоне среднетлетальных доз (4–6 Гр).

Таблица 13 – Показатели костномозгового кроветворения крыс разных групп при облучении в дозе 5 Гр и внутрижелудочном введении ВР-С2 в дозе 93,7 мг/кг

Группа	Срок наблюдения, сутки	Количество миелокариоцитов, $\times 10^9/\text{л}$
Биоконтроль	–	$162,0 \pm 1,8$
Облученный контроль	3	$22,4 \pm 1,0$
	10	$21,8 \pm 1,5$
	14	$36,2 \pm 2,2$
ВР-С2 + облучение	3	$28,6 \pm 1,2^*$
	10	$28,8 \pm 1,2^*$
	14	$48,6 \pm 1,8^*$
Примечание – * – $p < 0,05$ при сравнении с показателями группы облученный контроль ($n = 6$ в каждой группе).		

3.2.2. Определение механизма радиопротекторного действия композиции ВР-С2 на модели острой лучевой болезни у мышей

Опыты были проведены на мышах двух линий СВА и С57ВL/6.

3.2.2.1. Эффекты ВР-С2 у мышей самцов линии СВА при общем однократном радиационном воздействии

Полученные результаты (Таблица 14), свидетельствуют о том, что ВР-С2 увеличивает выживаемость облученных мышей линии СВА. ВР-С2

продемонстрировал наиболее выраженный радиозащитный эффект при введении в дозе 81,0 мг/кг и являлся более эффективным в диапазоне средне-летальных доз облучения. В этом диапазоне доз в сравнении с введением плацебо ВР-С2 увеличивал выживаемость животных, подвергшихся воздействию в дозах 5,0 Гр и 6,0 Гр на 16,7% и 25,0%, соответственно.

Кривые динамики выживаемости представлены на рисунке (Рисунок 7). При облучении всего тела в дозе 5,0 Гр (Рисунок 7А) не наблюдалось значительных изменений выживаемости ни в одной из групп, получавших ВР-С2, по сравнению с группой, получавшей плацебо. При воздействии в дозе 6,0 Гр (Рисунок 7Б) введение ВР-С2 в дозе 81,0 мг/кг привело к статистически значимому увеличению выживаемости. Относительно эффекта ВР-С2 не было отмечено зависимости от дозы композиции. При облучении в дозе 7,0 Гр (Рисунок 7В) различия в выживаемости между группой плацебо (выживаемость 0%) и экспериментальными группами, получавшими ВР-С2 в дозах 6,0, 81,0 и 156,0 мг/кг, не были статистически значимыми и составляли 4,2, 4,2 и 8,3%, соответственно.

Таблица 14 – Выживаемость (%) мышей линии СВА при остром радиационном поражении в зависимости от дозы облучения и опытного воздействия

Группа	Доза облучения (Гр)				
	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
Плацебо	91,7	75,0	50,0	0,0	0,0
ВР-С2 (6,0 мг/кг)	100,0	83,3	41,7	4,2	0,0
ВР-С2 (81,0 мг/кг)	100,0	91,7	75,0 *	4,2	0,0
ВР-С2 (156,2 мг/кг)	100,0	83,3	58,3	8,3	0,0

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с группой Плацебо (n=12 животных в группе; данные для 6,0 Гр и 7,0 Гр объединены из 2 серий экспериментов, n=24 животных на объединенную группу).

Эти результаты были использованы для расчета летальных доз облучения (Таблица 15). Наибольшее значение $LD_{50/30}$ было получено при введении ВР-С2 в дозе 81,0 мг/кг. Более низкие (6,0 мг/кг) или более высокие (156,2 мг/кг) дозы ВР-С2 оказывали меньшее влияние на среднелетальные дозы облучения. При введении в дозе 81,0 мг/кг ВР-С2 обеспечивал $ФИД=6,2/5,7=1,1$ у мышей СВА.

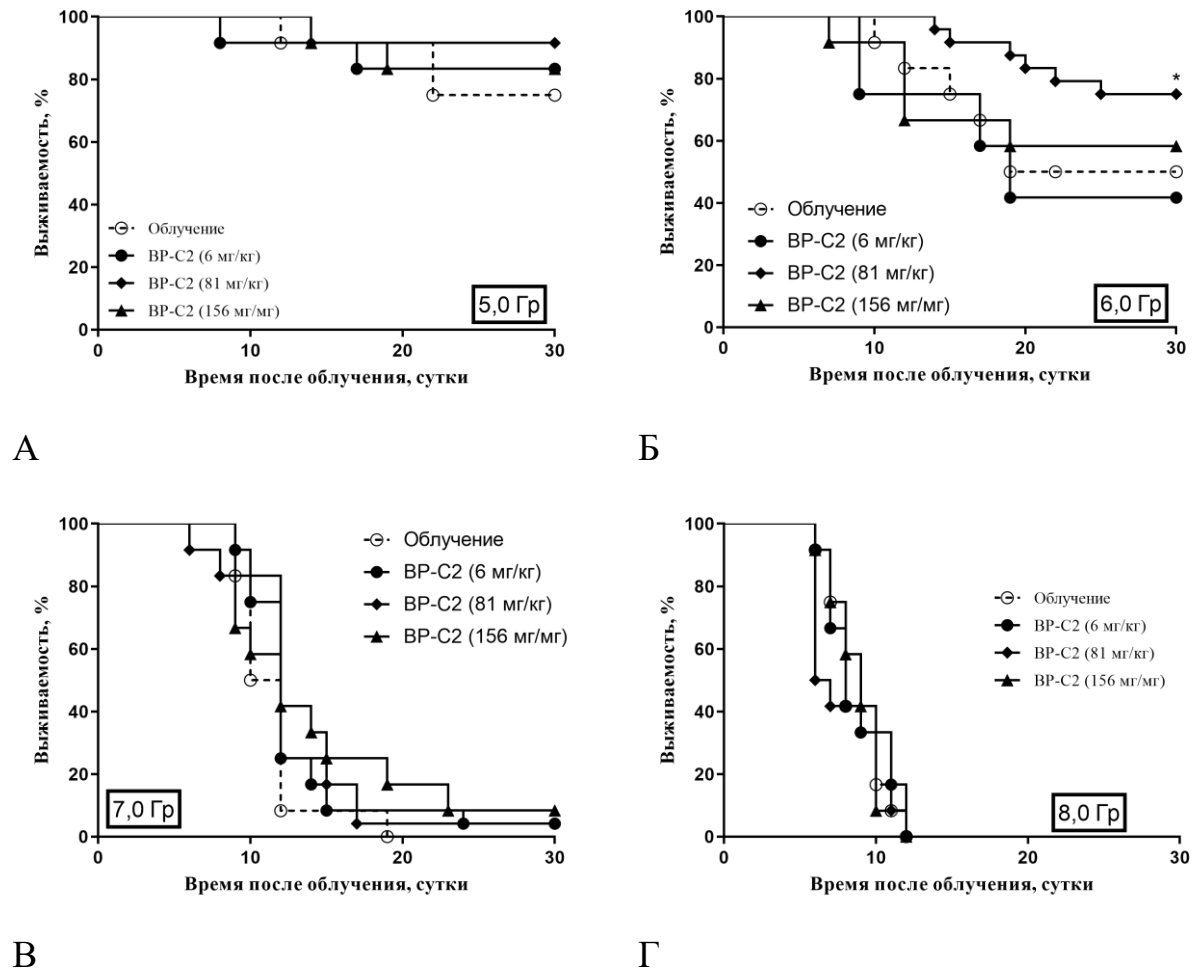


Рисунок 7 – Кривые выживаемости мышей СВА после однократного общего облучения. ВР-С2 или плацебо вводили через желудочный зонд 5 раз каждый второй день до и 5 раз каждый второй день после облучения ($n=12$ в группе; данные для 6,0 Гр и 7,0 Гр объединены из 2 серий экспериментов, $n=24$ на объединенную группу)

Таблица 15 – Значения летальных доз однократного общего облучения мышей линии СВА при введении плацебо или ВР-С2 в разных дозах

Группа	Доза (мг/кг)	Летальная доза радиации (Гр, М ± m, в скобках доверительный интервал)		
		ЛД _{16/30}	ЛД _{50/30}	ЛД _{84/30}
Плацебо	—	4,6	5,7 ± 0,2 (5,3–6,1)	6,8
ВР-С2	6,0	4,9	5,8 ± 0,2 (5,4–6,2)	6,2
	81,0	5,4	6,2 ± 0,2 (5,8–6,6)	7,1
	156,2	5,1	6,0 ± 0,2 (5,7–6,3)	6,9

Влияние ВР-С2 в дозе 81,0 мг/кг было также оценено на формирование эндогенных колоний в селезенке. Средние значения массы селезенки (Рисунок 8А) и количества КОЕс (Рисунок 8Б) были значительно выше у животных, получавших ВР-С2 в этой дозе. Доза 81,0 мг/кг была выбрана в качестве оптимальной для последующего краткосрочного эксперимента, в котором механизмы действия и эффективность ВР-С2 были оценены на мышах линии С57BL/6.

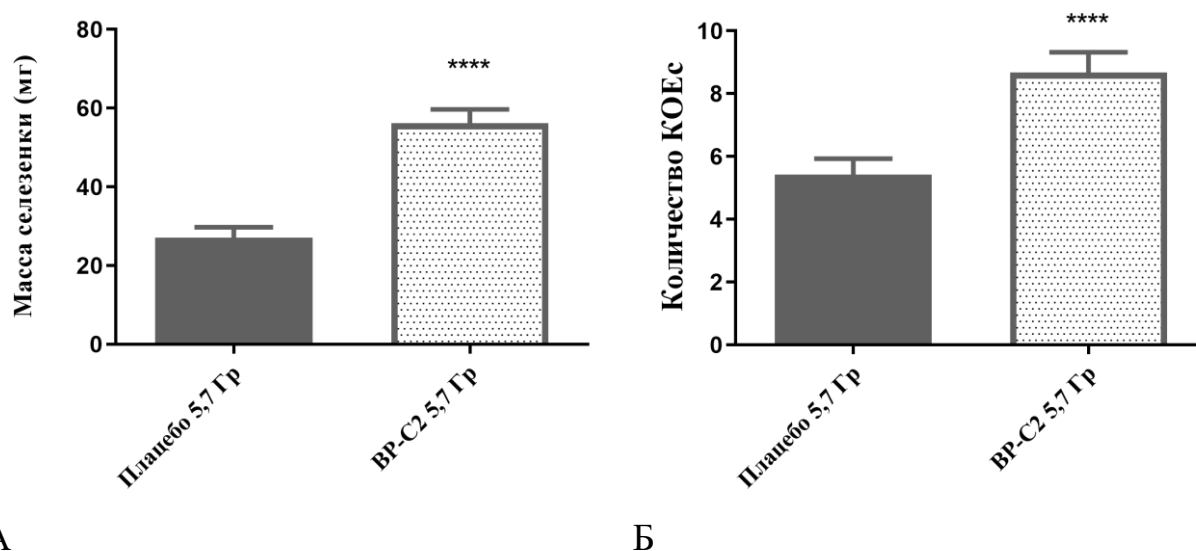


Рисунок 8 – Масса селезенки (А) и количество КОЕс (Б) у мышей линии СВА на 10 день после однократного облучения всего тела. ВР-С2 (81 мг/кг) вводили через желудочный зонд 5 раз каждый второй день до и 5 раз каждый второй день после облучения в дозе 5,7 Гр. **** – $p < 0,0001$ ($M \pm \text{СКО}$, $n=12$ в каждой группе)

3.2.2.2.Эффекты ВР-С2 у мышей самцов линии С57ВL/6 при остром радиационном поражении в краткосрочном опыте

Выживаемость облученных мышей С57ВL/6

На 8 день в группах плацебо, облученных в дозах 5,0, 6,0, 7,0 и 8,0 Гр, выживаемость животных составляла 100, 60, 10 и 0% (Таблица 16), соответственно. Выживаемость животных, получавших через 24 часа после облучения ВР-С2 в дозе 81,0 мг/кг, составила 100, 50, 50 и 10% при 5,0, 6,0, 7,0 и 8,0 Гр, соответственно (Таблица 16). Различие средней продолжительности жизни было статистически значимым только после облучения при 7,0 Гр и составило $5,5 \pm 0,4$ дня в группе плацебо и $7,0 \pm 0,4$ дня в группе ВР-С2 ($p < 0,05$).

Таблица 16 – Показатели выживаемости к 8 суткам мышей С57ВL/6 в зависимости от дозы облучения и опытного воздействия

Доза радиации	Группа	Выживаемость (%)	СПЖ (сутки, $M \pm m$)
5,0 Гр	Плацебо	100	$> 8,0$
	ВР-С2	100	$> 8,0$
6,0 Гр	Плацебо	60	$7,2 \pm 0,4$
	ВР-С2	50	$6,6 \pm 0,5$
7,0 Гр	Плацебо	10	$5,5 \pm 0,4$
	ВР-С2	50 *	$7,0 \pm 0,4^*$
8,0 Гр	Плацебо	0	$4,4 \pm 0,3$
	ВР-С2	10	$5,2 \pm 0,6$

Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой плацебо ($n=10$ в каждой группе).

Гематологические параметры у облученных мышей С57ВL/6

На 8 сутки после облучения число миелокариоцитов костного мозга у облученных животных было значительно снижено по сравнению с ложно

облученными животными (Рисунок 9). В группах, облученных в дозах 5,0 Гр и 6,0 Гр, количество миелокарицитов уменьшилось в 5-6 и 9-10 раз соответственно. Различия между группами плацебо и ВР-С2 не были статистически значимыми.

В пострadiационном периоде было зарегистрировано примерно 10-15-кратное снижение показателей клинического анализа периферической крови (данные не представлены вследствие отсутствия статистически значимых различий между группами плацебо и ВР-С2).

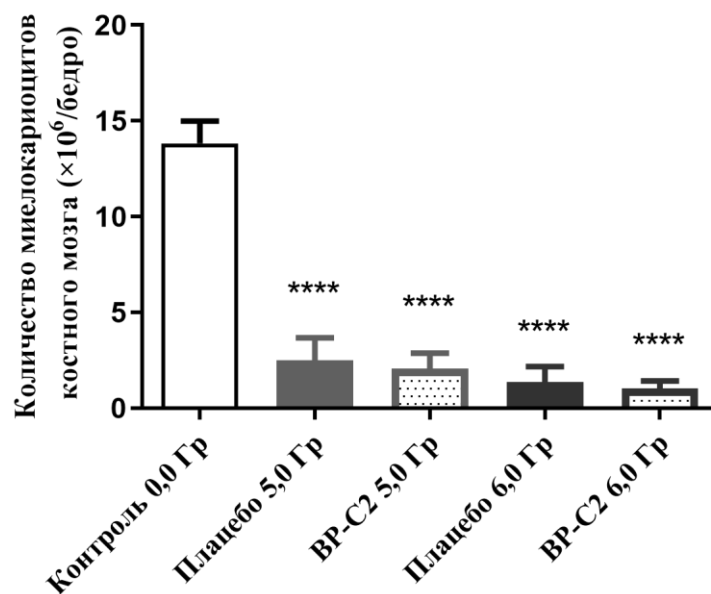


Рисунок 9 – Количество миелокарицитов костного мозга у мышей С57ВL/6 на 8 сутки после острого радиационного облучения. ВР-С2 (81 мг/кг) вводили через желудочный зонд ежедневно 7 раз, начиная с 24 часов после облучения.

**** – $p < 0,0001$ по сравнению с контролем ($M \pm СКО$)

У облученных животных на 8 день после облучения наблюдалось уменьшение массы селезенки (Рисунок 10А). Вес селезенки у ложно облученных животных составил $94,0 \pm 36,7$ мг, тогда как у животных, облученных при 5,0-8,0 Гр, он уменьшился в 2,5–3,4 раза. Различия в изменении веса селезенки между группой ВР-С2 и группой плацебо не достигли уровня статистической значимости. В то же время количество колоний селезенки, образовавшихся из выживших

гемопозитических стволовых клеток (Рисунок 10Б) у животных, получавших ВР-С2, было примерно вдвое больше, чем у животных группы плацебо. При облучении в дозе 5,0 Гр количество КОЕс составило $6,7 \pm 5,1$ в группе ВР-С2 и $2,3 \pm 2,3$ в группе плацебо ($p=0,02$).

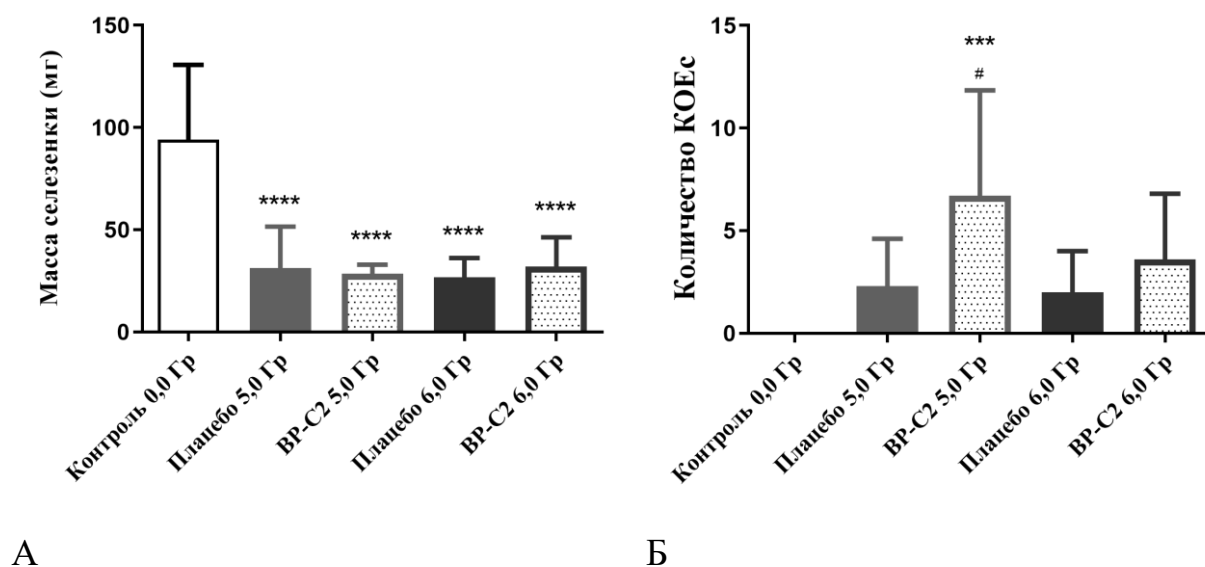


Рисунок 10 – Масса селезенки (А) и количество КОЕс (Б) у мышей С57ВL/6 на 8 день после острого радиационного облучения. ВР-С2 (81 мг/кг) вводили через желудочный зонд ежедневно 7 раз, начиная с 24 часов после облучения. Контрольная группа – 0,0 Гр n=10; группы плацебо: 5,0 Гр n=10, 6,0 Гр n=6; группы ВР-С2: 5,0 Гр n=10, 6,0 Гр n=5. Данные представлены в виде среднего значения и СКО. *** - $p<0,001$, **** - $p<0,0001$ по сравнению с контролем, # - $p=0,02$ по сравнению с группой Плацебо 5,0 Гр (n – количество животных)

Влияние на стволовые клетки, жизнеспособность и пролиферативную активность кишечного эпителия

Известно, что дозы облучения выше 8,0 Гр вызывают желудочно-кишечный радиационный синдром, степень тяжести которого можно оценить с помощью морфологического анализа жизнеспособных кишечных крипт. Результаты анализа, выполненного на образцах, полученных на 8 день после облучения животных в диапазоне доз 5,0-8,0 Гр, представлены на рисунке (Рисунок 11). Следует отметить,

что на эти сроки после облучения сравнение ложно облученных животных и облученных животных может использоваться для оценки влияния как на выживаемость кишечного эпителия, так и на его восстановление [99].

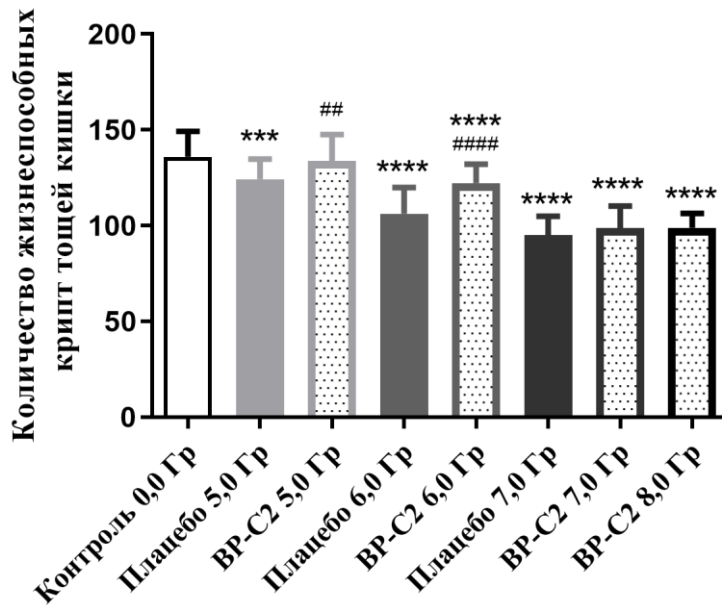


Рисунок 11 – Количество жизнеспособных крипт тощей кишки у мышей C57BL/6 на 8 день после однократного облучения всего тела. VP-C2 (81 мг/кг) вводили через желудочный зонд ежедневно 7 раз, начиная с 24 часов после облучения. Контрольная группа - 0,0 Гр n=10 (100); группы плацебо: 5,0 Гр n=10 (90), 6,0 Гр n=6 (60), 7,0 Гр n=1 (10); группы VP-C2: 5,0 Гр n=10 (83), 6,0 Гр n=5 (48), 7,0 Гр n=5 (46), 8,0 Гр n=1 (10). Данные представлены в виде среднего значения и СКО. *** - $p < 0,001$, **** - $p < 0,0001$ по сравнению с контролем; ## – $p = 0,0023$ при сравнении групп VP-C2 5,0 Гр и Плацебо 5,0 Гр; #### – $p < 0,0001$ при сравнении групп VP-C2 6,0 Гр и Плацебо 6,0 Гр (n – количество животных, в скобках – число оцененных поперечных срезов кишечника)

После облучения в дозе 5,0 Гр число жизнеспособных кишечных крипт в группах VP-C2 и плацебо составило $133,7 \pm 13,9$ и $124,2 \pm 10,5$ ($p = 0,0023$, приведено СКО), соответственно. При дозе облучения 6,0 Гр VP-C2 также увеличивал

количество жизнеспособных крипт ($122,2 \pm 9,8$ против $106,2 \pm 13,7$ в группе плацебо, $p < 0,0001$, приведено СКО).

При более высоких дозах оценка жизнеспособных крипт и эндогенного колониобразования в селезенке была невозможной вследствие преждевременной гибели животных.

При окраске антителами к Lgr5 выявлены небольшие клетки в основании крипт и, в некоторых случаях, в позиции +4 (от основания). Среднее количество Lgr5-позитивных клеток на крипту снижалось по мере увеличения дозы облучения от 5,0 Гр до 8,0 Гр, при этом в группах, получавших ВР-С2, их число было больше, чем в соответствующей группе Плацебо для каждой дозы облучения (за исключением группы 8,0 Гр, поскольку выживших животных при этой дозе к 8 дню не было) (Рисунок 12).

Клетки, положительные по PCNA, были обнаружены вдоль всей крипты, но преимущественно в ее основании и в положениях 4–10. Никаких значительных изменений в количестве клеток, позитивных по PCNA, эпителия крипт тощей кишки к 8 дню не наблюдалось ни в одной из групп (Рисунок 13).

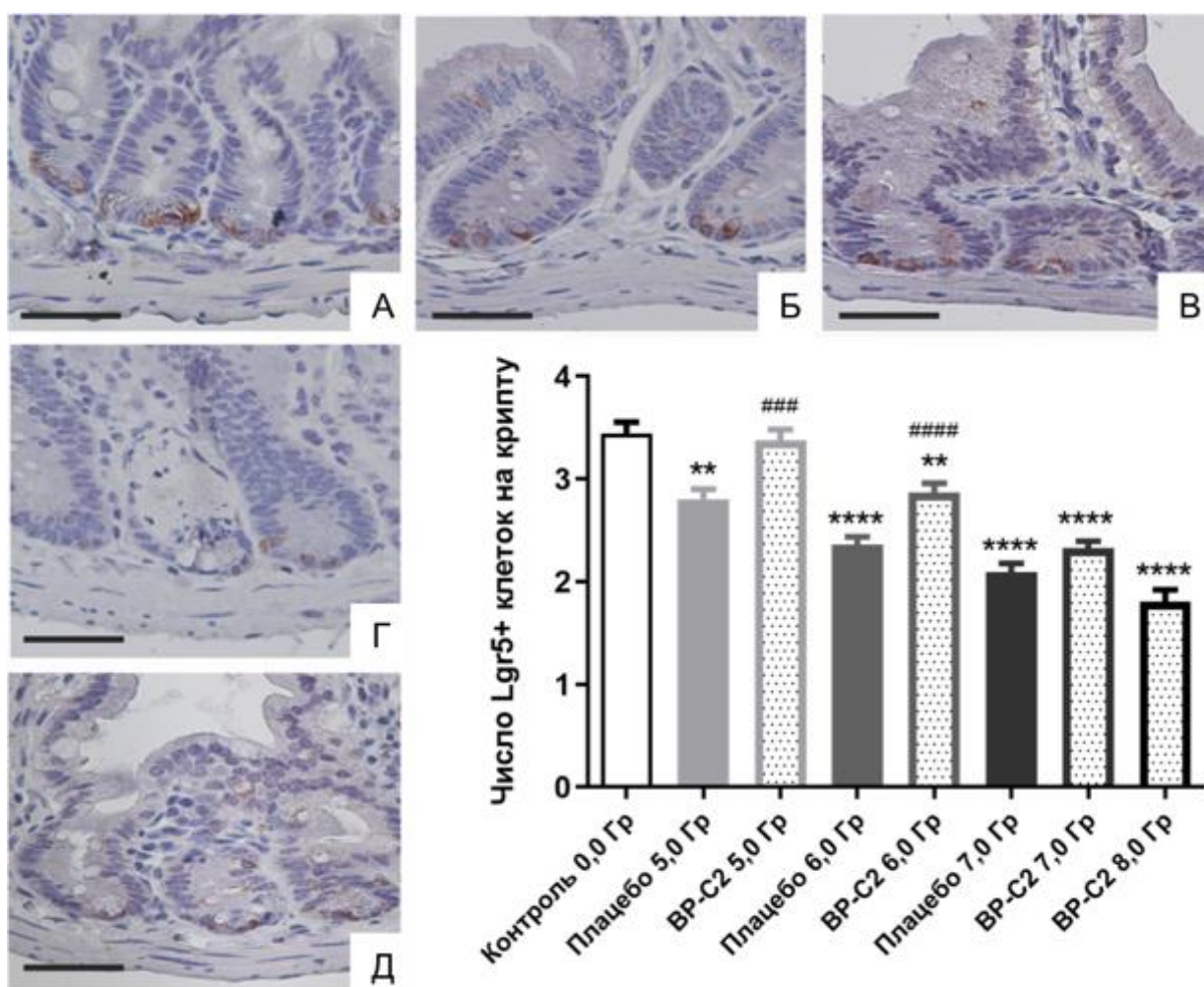


Рисунок 12 – Количество Lgr5+ клеток крипт тощей кишки у мышей C57BL/6 на 8 сутки после облучения всего тела. Показательные микрофотографии гистологических препаратов тощей кишки (окраска гематоксилином и диаминобензидином, масштабная метка – 500 мкм) – группа Контроль 0,0 Гр (А); группа Плацебо 5,0 Гр (Б); группа VP-C2 (81 мг/кг) 5,0 Гр (В); группа Плацебо 7,0 Гр (наблюдается выраженная потеря кишечных крипт вместе с уменьшением числа клеток Lgr5+) (Г); группа VP-C2 (81 мг/кг) 7,0 Гр (Д). ** - $p < 0,001$, **** - $p < 0,0001$ по сравнению с контролем. ### – $p < 0,001$, ##### – $p < 0,0001$ при сравнении групп VP-C2 и Плацебо (данные представлены в виде $M \pm m$)

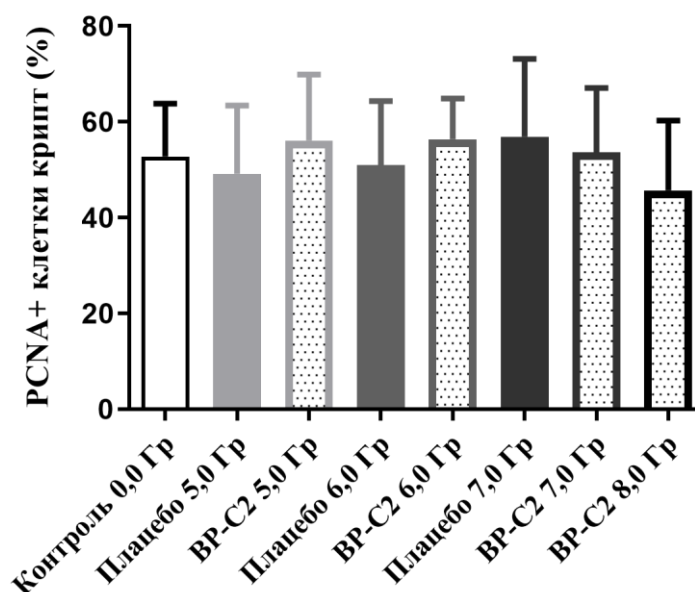


Рисунок 13 – Количество PCNA⁺ клеток эпителия крипт тощей кишки у мышей C57BL/6 на 8 сутки после радиационного облучения всего тела. VP-C2 (81 мг/кг) вводили через желудочный зонд ежедневно 7 раз, начиная с 24 часов после облучения. Данные представлены в виде среднего значения и СКО

3.2.3. Оценка влияния композиции VP-C2 на противоопухолевое действие радиотерапии

3.2.3.1. Исследование на модели лимфосаркомы Плисса у крыс при облучении всего тела

Исследование было проведено на 243 крысах-самцах линии Вистар, части животных была привита лимфосаркома Плисса в правое бедро. Радиозащитная доза композиции VP-C2 – 90 мг/кг, вводилась животным с питьевой водой на следующие сутки после облучения и ежедневно до конца эксперимента. Облучение всего тела проводилось на установке ИГУР-1 в дозе 5 Гр.

В ходе эксперимента установлено, что облучение в дозе 5 Гр вызывает гибель 50 % крыс (Таблица 17, Рисунок 14), СПЖ животных составляет $19,7 \pm 10,7$ суток.

Введение облученным животным ВР-С2 способствует увеличению выживаемости в среднем на 12 %, а СПЖ животных составила $22,6 \pm 10,0$ суток. В то же время необлученные животные, которым предварительно перевивали опухоль, погибали, не дожив до конца эксперимента, а СПЖ животных составила $11,5 \pm 3,7$ суток.

Выживаемость облученных крыс без опухоли соответствовала $LD_{50/30}$, а выживаемость крыс с лимфосаркомой Плисса была меньше, чем у животных без опухоли, подвергнутых облучению ($p=0,063$). Выживаемость животных с опухолью, подвергнутых облучению была достоверно меньше, чем у животных с опухолью без облучения ($p<0,001$). Введение ВР-С2 не влияло на выживаемость животных с опухолью при облучении.

Таблица 17 – Показатели выживаемости крыс с лимфосаркомой Плисса и без нее при однократном общем облучении с учетом введения ВР-С2

Группа	Кол-во животных	Выживаемость, %	СПЖ, сутки (M±СКО)
1 Интактные - контроль	32	100	>30
2 ВР-С2	34	100	>30
3 Облучение	34	50	$19,7 \pm 10,7$
4 Опухоль	37	0	$11,5 \pm 3,7^a$
5 Облучение + ВР-С2	34	62	$22,6 \pm 10,0$
6 Облучение + Опухоль	37	0	$8,1 \pm 3,1^b$
7 Облучение + Опухоль + ВР-С2	35	0	$8,7 \pm 3,1$

Примечание – Сравнение по тесту Log-rank (Mantel-Cox), ^a – $P=0,063$ между группами 3 и 4, ^b – $P<0,0001$ между группами 4 и 6. Результаты объединены из трех серий экспериментов.

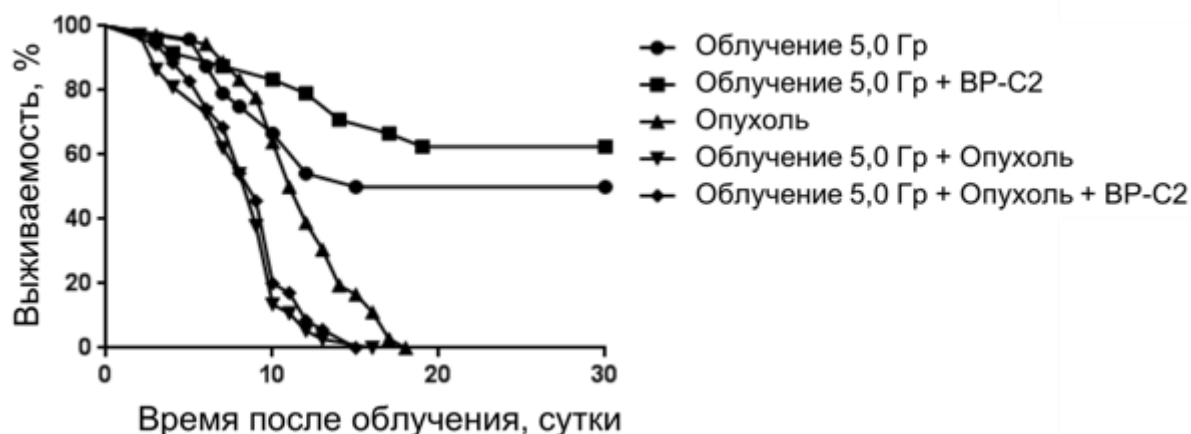


Рисунок 14 – Кривые выживаемости облученных крыс с лимфосаркомой Плисса, получавших композицию ВР-С2, и групп сравнения (гамма-облучение проведено на 7 сутки после перевивки опухоли)

Выявлено, что у облученных животных рост опухоли происходил не так интенсивно, как у контрольных животных с опухолью (Таблица 18). Измерение опухоли проводили за 1 сутки перед облучением (фон), в дальнейшем на 4, 7, 11, 14 сутки после радиационного воздействия (6, 11, 14, 18 и 21 сутки после перевивки опухоли, соответственно). Облучение животных с привитой лимфосаркомой Плисса приводило к более медленному развитию опухолевого процесса. Так, на 4 сутки (11 сутки после перевивки опухоли) исследования объем опухоли у облученных животных был на 81% больше, чем фоновые результаты и на 59% меньше, чем значения, полученные в контрольной группе крыс. Торможение роста опухоли в группе облученных животных с опухолью, получавших ВР-С2, достоверно не отличалось от животных, не получавших композицию, но было несколько ниже.

Таким образом, включение в схему лечения композиции ВР-С2 не оказывало достоверного влияния на скорость роста опухолевого узла по сравнению с группой облученных крыс с опухолью.

Таблица 18 – Объем лимфосаркомы Плисса и торможение ее роста у крыс в группах с однократным общим гамма-облучением и введением ВР-С2 с учетом сроков наблюдения

Группа	Показатель	Срок наблюдения, сутки после облучения [#]		
		-1	4	7
Опухоль	Объем опухоли, см ³	4,3±0,5	24,5±2,7	61,8±3,9
	n	37	35	34
Облучение +Опухоль	Объем опухоли, см ³	5,5±1,0	10,0±1,2 ***	34,6±3,1 ****
	n	37	32	27
	Торможение роста опухоли, %	-27	59	44
Облучение +Опухоль +ВР-С2	Объем опухоли, см ³	5,1±0,8	14,6±2,7 *	39,0±4,4 ****
	n	35	33	26
	Торможение роста опухоли, %	-18	40	37

Примечание – [#] – гамма-облучение проведено на 0 сутки (7 сутки после перевивки опухоли); * – $p < 0,05$ по сравнению с группой Опухоль (данные представлены в виде средней арифметической и ее ошибки).

При оценке показателей периферической крови животных выявлено, что фоновые значения числа лейкоцитов в день облучения до его проведения во всех группах были выше физиологической нормы. При этом у животных с лимфосаркомой Плисса наблюдалось развитие умеренного лейкоцитоза (Таблица 19). Изменения клеточного состава периферической крови после облучения носили черты характерные для костномозговой формы острой лучевой болезни (Таблица 19). Снижение числа лейкоцитов регистрировали уже на 1 сутки после радиационного воздействия. Максимальное же опустошение пула белой крови у облученных животных регистрировали на 4 сутки ($3,4 \pm 0,5 \times 10^9/\text{л}$), после чего следовал период «мнимого благополучия», о чем свидетельствовало кратковременное повышение числа лейкоцитов к 7 суткам (до $6,0 \pm 0,7 \times 10^9/\text{л}$).

Затем, после непродолжительного повторного спада (на 11 сутки до $3,1 \pm 0,2 \times 10^9/\text{л}$) регистрировали начало периода восстановления. К 19 суткам наблюдения количество лейкоцитов увеличивалось до $11,1 \pm 1,2 \times 10^9/\text{л}$.

При введении облученным животным композиции ВР-С2 описанная выше тенденция сохранялась, но уровень лейкопении был несколько меньше. Так, на 4 сутки уровень лейкопении в группе 3 облученных животных снижение лейкоцитов от фонового уровня составило 85%, а в группе 5 облученных животных, получавших ВР-С2 снижение было на уровне 72%, при этом повторного спада содержания лейкоцитов не наблюдали и начало периода восстановления наблюдали на 11 сутки, при уровне лейкоцитов $9,3 \pm 1,0 \times 10^9/\text{л}$. У животных, которым перевивали опухоль, на протяжении всего срока исследования, отмечали увеличение количества лейкоцитов в периферической крови в 1,1 – 1,5 раза по сравнению с интактным контролем. Облучение крыс с перевитой опухолью приводило к снижению числа лейкоцитов. Степень лейкопении у таких животных соответствовала таковой у облученного контроля без опухоли. Применение композиции ВР-С2 не оказывало влияния на восстановление числа лейкоцитов у животных с опухолью после облучения (группа 7), уровень лейкопении в этой группе на 4 сутки был больше значения, зарегистрированного у животных группы 6. Однако, в более поздние сроки количество лейкоцитов в группах 6 и 7 облучения с опухолью продолжало снижаться, что, вероятно, наряду с ростом опухоли послужило причиной более быстрой гибели животных этой группы.

Данные о динамике массы тела крыс приведены ниже (Таблица 20). Средняя масса тела интактных животных растет в течение всего срока исследования и к концу эксперимента достигает значений на 41% больших, чем фоновый показатель.

Таблица 19 – Общее количество лейкоцитов периферической крови ($\times 10^9/\text{л}$) у крыс с лимфосаркомой Плисса и без нее в разные сроки наблюдения после однократного общего облучения с учетом введения ВР-С2

Группа	Срок наблюдения, сутки						
	0 (фон) ^a	1	4	7	11	14	19
1 Интактный контроль (n=10)	22,5±3,7	22,2±0,6	22,3±0,4	22±1,0	21,5±0,3	23,0±1,1	24,3±1,1
2 ВР-С2 (n=12)	22,8±0,3	24,7±1,1	23,5±2,7	26,1±2,1	21,9±1,9	24,6±1,0	23,7±1,3
3 Облучение (n=12)	22,8±0,3	13,6±0,5 *#	3,4±0,5 *#	6,0±0,7 *#	3,1±0,2 *#	4,2±0,4 *#	11,1±1,2 *#
4 Опухоль (n=15)	28,2±0,9	31,2±0,9 *#	35,1±1,6 *#	37,7±1,5 *#	40,1±5,2 *#	43,4±2,4 *#	-
5 Облучение + ВР-С2 (n=12)	22,9±0,8	18,3±0,5 *#	6,4±1,0 *#	5,9±0,6 *#	9,3±1,0 *#	10,0±0,7 *#	11,9±0,6 *#
6 Облучение + Опухоль (n=15)	28,9±1,2	19,8±1,0*#	3,8±0,4 *#	4,0±0,6 *#	2,7±1,4 *#	–	–
7 Облучение + Опухоль + ВР-С2 (n=13)	29,0±1,3	19,3±0,9 *#	9,1±0,7 *#	4,0±0,9 *#	2,0±0,2 *#	–	–
<p>Примечания</p> <p>1^a – за 0 сутки опыта принят день облучения, соответствующий 7 суткам после прививки опухоли животным.</p> <p>2 * – различия с фоновыми данными достоверны при $p < 0,05$ (сравнение по горизонтали); # - различия с показателями контрольной группы достоверны при $p < 0,05$ (сравнение по вертикали); $M \pm m$.</p>							

Таблица 20 – Масса тела крыс (г) с лимфосаркомой Плисса и без нее в разные сроки наблюдения при однократном общем облучении с учетом введения ВР-С2

Группа	Срок наблюдения, сутки						
	-6 (фон) ^a	1	4	7	11	14	19
1 Интактный контроль (n=10)	164,0± 1,5	186,7± 2,8*	198,4± 3,9*	218,3± 5,0*	199,9± 5,2*	218,0± 6,8*	231,8± 8,0*
2 ВР-С2 (n=12)	164,3± 1,2	180,6± 3,9*	191,8± 5,5*	196,4± 8,5*#	193,3± 8,1*	210,5± 9,5*	225,1± 11,9*
3 Облучение (n=12)	164,3± 1,3	182,4± 4,5*	192,8± 6,3*	197,0± 6,0*#	187,1± 8,2*	206,3± 3,6*	209,8± 3,7*#
4 Опухоль (n=15)	164,3± 1,5	193,3± 2,5*	204,2± 3,4*	237,7± 6,0*#	241,2± 7,3*#	245,3± 19,8*	–
5 Облучение +ВР-С2 (n=12)	164,2± 1,4	176,6± 3,4*#	183,2± 5,2*#	190,3± 5,9*#	194,7± 6,1*	195,0± 6,6*#	212,0± 6,9*
6 Облучение +Опухоль (n=15)	164,1± 0,9	177,8± 3,3*	182,7± 4,1*#	190,2± 4,6*#	184,5± 14,5	–	–
7 Облучение +Опухоль +ВР- С2 (n=13)	164,1± 1,1	191,5± 4,6*	197,8± 5,1*	206,5± 4,4*	187,0± 7,2*	–	–

Примечания

1 – за 0 сутки опыта принят день облучения, соответствующий 7 суткам после прививки опухоли животным.

2 – * – различия с фоновыми данными достоверны при $p < 0,05$ (сравнение по горизонтали); # - различия с показателями контрольной группы достоверны при $p < 0,05$ (сравнение по вертикали)

Прирост массы тела облученных крыс менее выражен, а в сравнении с интактными животными их вес был ниже на 3–10 %. Масса животных с опухолью увеличивалась пропорционально срокам исследования и превышала значения интактных крыс, что связано с увеличением размеров самой опухоли. Облучение таких животных не приводило к резкому снижению их веса, а введение композиции ВР-С2 оказывало защитный эффект в отношении снижения массы тела облученных животных с опухолью.

Таким образом, установлено, что облучение в дозе 5 Гр вызывает гибель 50 % животных. Введение на фоне облучения композиции ВР-С2 оказывает положительное влияние на выживаемость крыс обеспечивая защиту в среднем 12 % животных (8 – 17 %, по результатам трех серий экспериментов). Применение композиции ВР-С2 способствует снижению развития постлучевой лейкопении (в 1,8 раза) в ранние сроки после облучения животных (на 4 сутки). Облучение в ЛД_{50/30} животных с привитой лимфосаркомой Плисса оказывает цитостатический эффект, проявляющийся в торможении роста опухоли на 44 – 59%. При введении облученным крысам с лимфосаркомой Плисса композиции ВР-С2 торможение роста опухоли составляет 37 – 40%.

3.2.3.2. Исследование локальной высокоэнергетической протонной терапии на модели перевиваемой аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ у мышей BALB/c

Привитую подкожно в область правого бедра аденокарциному толстого кишечника мышей АКАТОЛ подвергали локальному облучению протонами с энергией 1000 МэВ, поглощенная доза 10 Гр. Мышам вводили ВР-С2 в дозе 90 мг/кг перорально в лечебно-профилактическом режиме за 7 суток до облучения и далее ежедневно до конца опыта и в лечебном режиме – начиная с 24 часов после облучения ежедневно до конца эксперимента.

Средняя продолжительность жизни мышей BALB/c с аденокарциномой АКАТОЛ составила $49,2 \pm 4,8$ суток, а в группе с локальным облучением – $64,3 \pm 6,6$ суток (УПЖ=31%, $p=0,093$). В группе АКАТОЛ + ВР-С2 средняя продолжительность жизни мышей составила $43,5 \pm 4,2$ суток. В группах АКАТОЛ + Облучение с введением ВР-С2 по лечебной схеме СПЖ= $51,7 \pm 5,3$ суток (УПЖ=5%), а с введением ВР-С2 по лечебно-профилактической схеме СПЖ= $54,0 \pm 3,8$ суток (УПЖ=10%). Включение в схему лучевой терапии композиции ВР-С2 как при лечебной, так и при лечебно-профилактической схемах применения, приводило к некоторому снижению эффективности противоопухолевого воздействия.

Аналогичные данные были получены при анализе динамики объема опухолевого узла (Таблица 21). Показатель торможения роста опухоли при сочетании облучения с ВР-С2 вне зависимости от режима применения был несколько меньше, чем при применении только лучевого воздействия на опухоль.

Таблица 21 – Размеры первичного опухолевого узла (см^3) в различные сроки опыта у мышей BALB/c с аденокарциномой АКАТОЛ при локальном облучении и применении ВР-С2

Группа	Сутки опыта				
	0	5	15	30	45
АКАТОЛ	$0,26 \pm 0,04$	$1,87 \pm 0,41$	$4,74 \pm 0,38$	$6,95 \pm 0,51$	$8,43 \pm 0,97$
АКАТОЛ + Облучение	$0,27 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,27^*$ (62%)	$3,26 \pm 0,41^*$ (31%)	$5,69 \pm 0,61^*$ (18%)	$7,73 \pm 0,50$ (8%)
АКАТОЛ + ВР-С2	$0,28 \pm 0,04$	$1,85 \pm 0,31$ (1%)	$4,43 \pm 0,31$ (7%)	$6,00 \pm 0,74^a$ (14%)	$8,38 \pm 0,85$ (1%)
АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛП)	$0,25 \pm 0,03$	$1,37 \pm 0,24$ (27%)	$4,36 \pm 0,42$ (8%)	$6,22 \pm 0,44$ (11%)	$8,24 \pm 0,71$ (2%)
АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛПП)	$0,25 \pm 0,03$	$1,86 \pm 0,37$ (0%)	$4,57 \pm 0,41$ (4%)	$5,68 \pm 0,66^b$ (18%)	$8,62 \pm 0,66$

Примечания

1 В скобках указано ТРО по отношению к группе АКАТОЛ.

2 * – $p < 0,05$ по сравнению с группой АКАТОЛ, ^a – $p = 0,461$ по сравнению с группой АКАТОЛ, ^b – $p = 0,068$ по сравнению с группой АКАТОЛ.

3 ЛП – лечебный режим применения через 24 часа после облучения, ЛПП – лечебно-профилактический режим применения начиная за 7 суток до облучения.

Гематологический анализ подтвердил отсутствие выраженного системного действия используемого метода лучевой терапии (Таблица 22, Таблица 23). Статистически значимые изменения абсолютного и относительного содержания клеток лейкоцитарного ряда и эритроцитов отсутствовали. У животных с опухолью после облучения отмечено меньшее относительное содержание моноцитов на 20 сутки после облучения.

Таблица 22 – Показатели лейкограммы на 10 и 20 сутки опыта у мышей BALB/c с аденокарциномой АКАТОЛ при локальном облучении и введении ВР-С2

Сутки	Интактный контроль	АКАТОЛ	АКАТОЛ + Облучение	АКАТОЛ + ВР-С2	АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛП)	АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛПП)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$						
10	9,3 \pm 1,3	9,7 \pm 1,3	12,9 \pm 4,2	9,7 \pm 0,6	10,3 \pm 1,0	10,1 \pm 0,4
20		9,9 \pm 0,5	10,1 \pm 1,1	9,8 \pm 0,6	9,9 \pm 0,8	9,2 \pm 0,4
Лимфоциты, %						
10	51,6 \pm 7,1	54,0 \pm 2,0	56,8 \pm 6,8	53,6 \pm 2,9	52,6 \pm 7,6	55,8 \pm 4,6
20		49,4 \pm 5,6	47,8 \pm 2,7	54,6 \pm 5,4	50,2 \pm 5,3	55,6 \pm 5,4
Гранулоциты, %						
10	37,0 \pm 6,5	35,6 \pm 1,8	32,2 \pm 6,0	35,8 \pm 2,7	34,0 \pm 5,3	33,0 \pm 4,7
20		38,4 \pm 5,4	44,3 \pm 2,6	33,8 \pm 3,7	40,0 \pm 4,3	33,6 \pm 4,1
Моноциты, %						
10	11,8 \pm 0,9	10,4 \pm 1,9	11,2 \pm 0,7	10,6 \pm 0,5	13,6 \pm 2,6	11,2 \pm 1,0
20		12,2 \pm 1,7	8,0 \pm 0,6 *	11,8 \pm 3,0	9,8 \pm 1,9	10,8 \pm 1,9
Примечания						
1 * – $p < 0,05$ по сравнению с интактным контролем.						
2 ЛП – лечебный режим применения через 24 часа после облучения, ЛПП – лечебно-профилактический режим применения начиная за 7 суток до облучения.						

На фоне применения ВР-С2, особенно в лечебно-профилактическом режиме, наблюдалось умеренная активация красного костного мозга животных, выражающаяся в увеличении продукции форменных элементов крови (ретикулоцитоз, макроцитоз, умеренный тромбоцитоз, легкая гипохромность крови, высокие значения эритроцитарного анизоцитоза – на 10-20 сутки эксперимента - Таблица 23).

Таблица 23 – Показатели форменных элементов эритроидного ряда и тромбоцитов крови на 10 и 20 сутки опыта у мышей BALB/c с аденокарциномой АКАТОЛ при локальном облучении и применении ВР-С2

Сутки	Интактный контроль	АКАТОЛ	АКАТОЛ + Облучение	АКАТОЛ + ВР-С2	АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛП)	АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛПП)
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$						
10	7,4 \pm 0,5	6,5 \pm 0,8	6,5 \pm 0,4	6,7 \pm 0,3	7,5 \pm 0,3	7,0 \pm 0,5
20		7,0 \pm 0,6	7,1 \pm 0,4	7,1 \pm 0,5	6,9 \pm 0,5	6,7 \pm 0,4
Анизоцитоз эритроцитов, %						
10	14,4 \pm 0,7	13,9 \pm 0,6	13,8 \pm 0,4	14,4 \pm 0,8	14,3 \pm 0,3	15,5 \pm 0,6
20		14,6 \pm 0,4	16,2 \pm 0,7	14,7 \pm 0,6	17,9 \pm 0,8 * #	18,0 \pm 0,7 * #
Средний объем эритроцитов, фл						
10	50,5 \pm 0,7	50,9 \pm 0,8	52,1 \pm 0,3	51,4 \pm 0,7	53,2 \pm 0,7	52,5 \pm 0,6
20		51,5 \pm 0,7	56,3 \pm 2,2 *	51,7 \pm 1,3	57,9 \pm 1,5 * #	55,9 \pm 1,4
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг						
10	13,9 \pm 0,4	13,6 \pm 0,3	16,6 \pm 0,7 * #	14,1 \pm 0,3	17,0 \pm 0,4 * #	13,6 \pm 0,2
20		13,5 \pm 0,2	12,7 \pm 0,2 * #	13,5 \pm 0,3	12,3 \pm 0,2 * #	12,6 \pm 0,4 *
Ретикулоциты, %						
10	9,6 \pm 0,9	9,2 \pm 1,3	9,0 \pm 0,3	9,6 \pm 1,1	9,0 \pm 1,0	10,0 \pm 0,7
20		10,0 \pm 0,8	12,3 \pm 1,4	10,2 \pm 1,0	13,8 \pm 1,0 * #	14,2 \pm 0,7 * #
Тромбоциты, $\times 10^9/л$						
10	554 \pm 54	620 \pm 108	490 \pm 62	668 \pm 37	976 \pm 92 *	743 \pm 40 *
20		716 \pm 40	767 \pm 52 *	714 \pm 61	731 \pm 30 *	708 \pm 51
Примечания						
1 * – $p < 0,05$ при сравнении с интактным контролем, # – $p < 0,05$ при сравнении с группой АКАТОЛ.						
2 ЛП – лечебный режим применения через 24 часа после облучения, ЛПП – лечебно-профилактический режим применения начиная за 7 суток до облучения.						

Оценка содержания в крови мышей с развивающейся опухолью уровня интерлейкина-1 β – маркера интенсивности воспалительных процессов в организме, показал существенное увеличение этого показателя при развитии новообразования, усугубляющееся лучевой терапией (Таблица 24). Показано выраженное уменьшение продукции IL-1 β при применении радиопротекторной композиции ВР-С2, более значимое при использовании его в лечебно-профилактическом режиме.

Таблица 24 – Содержание интерлейкина-1 β (нг/мл) на 10 и 20 сутки в крови мышей BALB/c с аденокарциномой АКАТОЛ при локальном облучении и применении ВР-С2

Сутки	Интактный контроль	АКАТОЛ	АКАТОЛ + Облучение	АКАТОЛ + ВР-С2	АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛП)	АКАТОЛ + Облучение + ВР-С2 (ЛПП)
10	105,0 \pm 12,4	149,1 \pm 26,3	216,8 \pm 50,1 *	141,4 \pm 21,2	139,8 \pm 24,7	133,0 \pm 22,8
		205,7 \pm 34,5 *	210,7 \pm 19,5 *	182,0 \pm 13,1 *	159,7 \pm 33,3	127,9 \pm 21,4 #

Примечания

1 * – $p < 0,05$ при сравнении с интактным контролем, # – $p < 0,05$ при сравнении с группой АКАТОЛ + Облучение.

2 ЛП – лечебный режим применения через 24 часа после облучения, ЛПП – лечебно-профилактический режим применения начиная за 7 суток до облучения.

3.3. Исследования эффективности полифенольной композиции ВР-С3 в опытах на мышах

3.3.1. Определение эффективной дозы ВР-С3 на моделях миелодепрессий, вызванных циклофосфамидом и 5-фторурацилом у мышей

Исследовано 3 уровня доз ВР-С3 на модели миелодепрессии вызванной циклофосфамидом (300 мг/кг) у мышей. ВР-С3 вводили за 7 дней до введения цитостатика.

Введение цитостатика (на 0 сутки) вызывало снижение массы тела экспериментальных животных к 4 дню опыта по сравнению с исходными данными на -6 день на 7% и на 2-5% при сочетании с ВР-С3. Снижение массы тела у животных, получивших цитостатик и ВР-С3 в дозе 150 мг/кг, было незначительным и статистически не отличалось от данных для контрольных животных. К 7 дню опыта происходило восстановление массы тела во всех группах (Таблица 25).

Различий в потреблении корма и жидкости между опытными и контрольными группами не обнаружено.

У животных каждой группы проводили исследование гемограммы на -6, 0 сутки (до введения циклофосфамида в этот день), на 4, 7 и 11 сутки опыта (Таблица 26).

Минимум содержания лейкоцитов в крови экспериментальных животных зафиксирован на 4 сутки после введения цитостатика (результаты статистически значимо отличаются от контроля). Падение содержания составило 78% по сравнению с исходными данными для этих животных при использовании циклофосфамида и дозозависимо уменьшалось в опытных группах, составив 72%, 67% и 54% для доз ВР-С3 15, 75 и 150 мг/кг, соответственно.

Таблица 25 – Масса тела (г) мышей различных групп, получавших циклофосфамид, с учетом сроков опыта

Группа	День опыта			
	-6	4	7	11
Контроль	27,5±1,3	29,6±1,2	28,8±1,1	29,6±2,6
ЦФ (300 мг/кг)	28,1±0,7	26,3±2,0*	28,0±1,0	29,4±0,8
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (15 мг/кг)	27,4±1,1	26,5±1,1*	27,2±0,3	27,9±1,3
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	27,8±1,3	26,3±1,6*	27,1±0,6	26,4±1,5
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (150 мг/кг)	28,2±1,2	27,6±0,7	27,2±1,6	27,3±2,1
Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Стьюдента), данные приведены в виде $M \pm \text{СКО}$.				

На 7 сутки происходило восстановление уровня лейкоцитов в крови животных с сохранением положительного эффекта композиции при ее использовании для сопроводительного лечения в средней и высокой дозах. В группе ЦФ содержание лейкоцитов составило 45% от исходного уровня, в опытных группах – 50%, 21% и 5%, соответственно. К 11 дню опыта показатели «белой» крови достигли уровня контрольной группы.

Таблица 26 – Общее количество лейкоцитов ($\times 10^9/\text{л}$) в крови мышей различных групп, получавших циклофосфамид, с учетом сроков опыта

Группа	День опыта				
	-6	0	4	7	11
Контроль	13,72±1,39	16,14±3,87	11,48±1,46	18,2±0,98	10,26±1,26
ЦФ (300 мг/кг)	10,66±1,17	13,96±0,64	2,40±0,80**	5,82±0,90***	18,04±2,71
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (15 мг/кг)	12,74±1,38	18,32±2,57	3,60±0,88**	6,42±1,20***	13,45±1,27
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	11,16±0,50	13,04±0,51	3,68±0,67**	8,84±0,89***	17,44±2,12
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (150 мг/кг)	11,00±0,64	13,54±1,14	5,12±1,45*	10,54±1,59**	18,94±2,50
Примечание – * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой (критерий Стьюдента), данные приведены в виде $M \pm \text{СКО}$.					

Циклофосфамид существенно не влиял на «красный» росток кроветворения – незначительная анемия, маркировавшаяся 12-17% снижением содержания эритроцитов, начиналась на 4 сутки от введения цитостатика и продолжалась до конца периода наблюдения, достигая уровня статистической значимости только на 7 сутки опыта (Таблица 27).

Использование композиции ВР-С3 существенно не влияло на тяжесть, хотя несколько задерживало сроки развития анемии (Таблица 27).

Таблица 27 – Содержание эритроцитов ($\times 10^{12}/л$) в крови мышей различных групп, получавших циклофосфамид, с учетом сроков опыта

Группа	День опыта				
	-6	0	4	7	11
Контроль	9,54 \pm 0,25	10,90 \pm 0,36	9,94 \pm 0,15	11,14 \pm 0,32	10,89 \pm 0,34
ЦФ (300 мг/кг)	11,40 \pm 0,56	10,74 \pm 0,40	8,92 \pm 0,89	9,44 \pm 0,21*	9,27 \pm 0,11
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (15 мг/кг)	10,67 \pm 0,63	10,58 \pm 0,51	9,16 \pm 0,53	10,08 \pm 0,44	9,74 \pm 0,14
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	11,20 \pm 0,21	10,80 \pm 0,34	9,83 \pm 0,33	9,79 \pm 0,41	9,88 \pm 0,49
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (150 мг/кг)	9,54 \pm 0,43	10,29 \pm 0,58	9,19 \pm 0,48	9,28 \pm 0,14*	9,60 \pm 0,37
Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (критерий Стьюдента), данные приведены в виде $M \pm СКО$.					

Эвтаназия животных (по 5 из группы) проводилась на 4 и 11 сутки опыта; была проведена полная аутопсия с макроскопической оценкой и взвешиванием, гистологической оценке подвергнуты селезенка и лимфоузел. По результатам патоморфологического исследования, различий между группой, получавшей только циклофосфамид, и группами, дополнительно получавшими ВР-С3, не выявлено. Изучение клеточности костного мозга проводили на препарате левой бедренной кости мыши (Таблица 28).

Как следует из представленных данных, на 4 день опыта наблюдалось резкое снижение клеточности костного мозга у всех животных, получавших циклофосфамид. При применении ВР-С3 количество выживших клеток костного мозга было выше, чем у животных, получавших только циклофосфамид, на 9%, 49% и 86% для низкой, средней и высокой дозы, соответственно. К 11 дню опыта

происходило восстановление клеточности костного мозга во всех группах, а при применении ВР-С3 в дозе 150 мг/кг показатели статистически достоверно превышали таковые для контроля.

Таблица 28 – Количество миелокариоцитов ($\times 10^6$ /бедро) у мышей различных групп, получавших циклофосфамид, на 4 и 11 сутки опыта

Группа	День опыта	
	4	11
Контроль	13,6 \pm 2,3	13,4 \pm 0,8
ЦФ (300 мг/кг)	0,8 \pm 0,3 ***	14,7 \pm 1,2
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (15 мг/кг)	0,9 \pm 0,4 ***	14,9 \pm 1,4
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	1,3 \pm 0,3 ***	14,7 \pm 2,4
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (150 мг/кг)	1,5 \pm 0,3 ***	18,6 \pm 3,5 ***
Примечание – *** – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой (критерий Стьюдента), данные приведены в виде $M \pm СКО$.		

Таким образом, для следующего цикла исследований была выбрана доза ВР-С3 75 мг/кг, как оказывающая достаточный эффект на кроветворение и не приводящая к избыточной стимуляции клеток костного мозга.

Проводили исследование эффективной дозы 75 мг/кг ВР-С3 на моделях миелодепрессии, вызванной 5-фторурацилом, и повторно на модели лейкопении, вызванной циклофосфамидом в сравнении с филграстимом (20 мг/кг в сутки, подкожно, через 24 часа после введения циклофосфамида).

Как следует из представленных данных (Таблица 29), одним из проявлений токсичности препаратов химиотерапии было снижение массы тела. При этом циклофосфамид вызывал наибольшее по величине (9-15% по сравнению с данными для нулевого дня) и наиболее стойкое (статистическая значимость сохранялась до 11 дня опыта) снижение массы тела экспериментальных животных. При введении 5-ФУ снижение массы тела экспериментальных животных составляло 4-11%. Композиция ВР-С3 не увеличивала токсичность вышеупомянутых цитостатиков, в

то время как в случае применения филграстима наблюдалось резкое снижение массы тела (15-21% по сравнению с исходными данными) и гибель всех экспериментальных животных, получавших комбинацию циклофосфида и филграстима, к 11 дню опыта.

Таблица 29 – Масса тела (г) животных разных групп, получавших 5-фторурацил или циклофосфамид, с учетом сроков опыта

Группа	День опыта				
	-6	0	4	7	11
Контроль	34,5±0,5	34,9±0,5	35,2±0,5	35,8±0,6	35,0±0,7
5-ФУ (150 мг/кг)	33,2±0,4	33,2±0,4	30,9±0,5**	30,4±0,7**	31,2±0,9*
5-ФУ (150 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	34,3±0,6	34,1±1,0	32,1±1,0*	32,8±1,3	32,4±1,4
ЦФ (300 мг/кг)	32,1±0,8	32,8 ±0,7	29,9±0,9**	29,3±1,6*	28,0±1,7*
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	33,4±0,4	33,7± 0,5	30,2±0,3**	30,1±0,6**	30,2±0,9**
ЦФ (300 мг/кг) + Филграстим (20 мг/кг)	31,9±0,9	33,0 ± 1,0	28,1±1,1**#	26,0±3,1	–
ВР-С3 (75 мг/кг)	33,8±0,5	34,8±0,5	34,7±0,6	33,7±0,8	34,2±0,5

Примечание – * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, по сравнению с интактным контролем, # – $p < 0,05$, по сравнению с группой контроля, получавшей только соответствующий цитостатик (t-тест Стьюдента).

Динамика гематологических показателей (изменения содержания лейкоцитов и эритроцитов по сравнению с нулевым днем опыта) у животных в опыте приведена ниже (Рисунок 15, Рисунок 16). Как видно из представленных данных, высокая токсичность циклофосамида в выбранной дозе сопровождалась выраженным падением содержания лейкоцитов на 92% к 4 дню опыта (снижение эритроцитов на 14%). Токсическое влияние в случае использования 5-фторурацила выражалось в снижении содержания лейкоцитов на 50%, при этом развивалась более выраженная анемия, чем при использовании циклофосамида – падение уровня содержания эритроцитов достигало 35% и сохранялось до конца опыта.

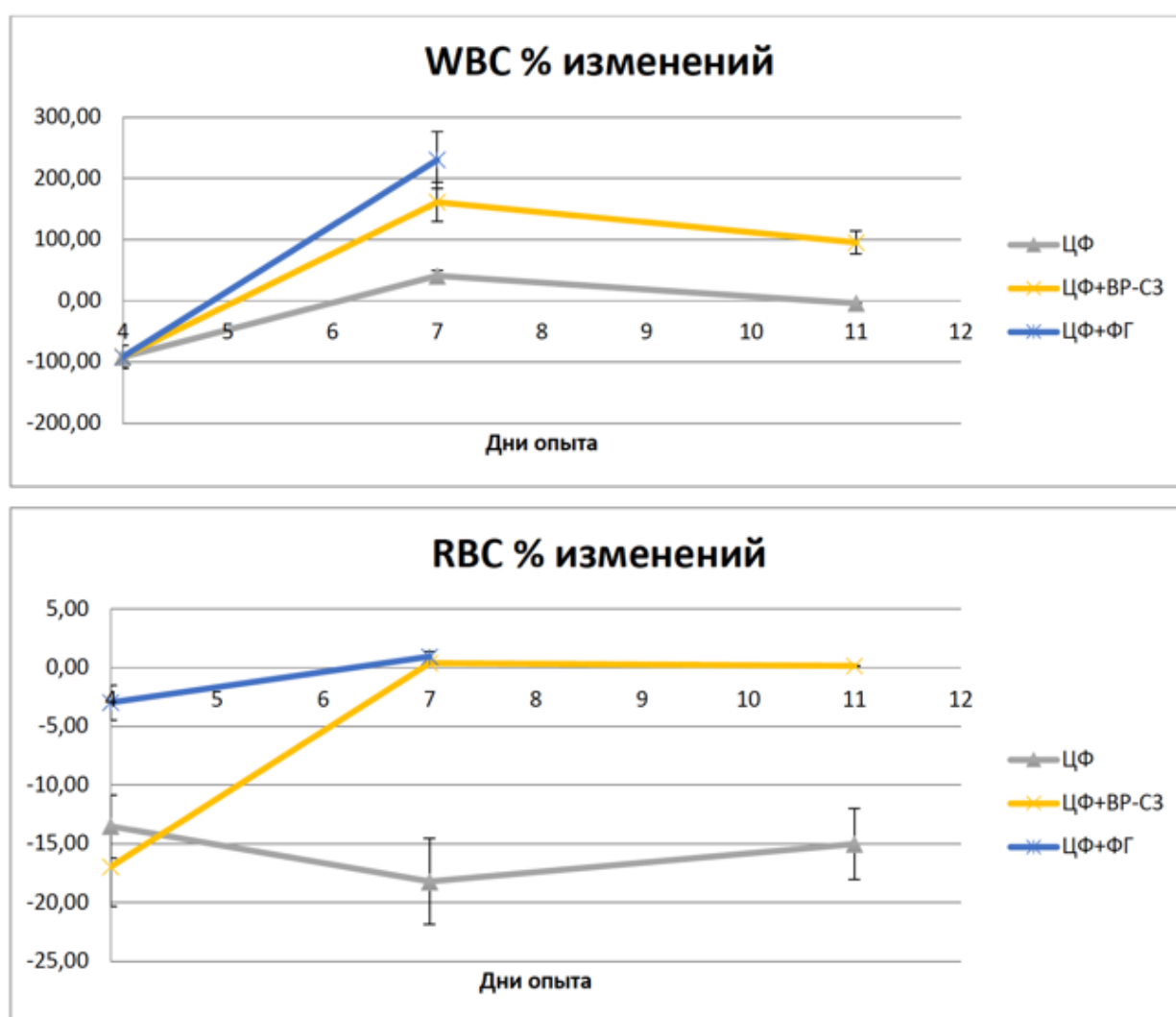


Рисунок 15 – Относительное содержание лейкоцитов (WBC) и эритроцитов (RBC) в крови мышей, получавших циклофосфамид (ЦФ), ВР-С3 и филграстим (ФГ).

За 100% приняты значения в группах на 0 сутки до введения цитостатика

Влияние композиции ВР-СЗ выразилось в стимуляции гемопоэза – показатели крови восстанавливались быстрее, чем при монотерапии цитостатиками.

В случае использования циклофосфида в комбинации со стимуляторами миелопоэза Филграстимом наблюдался резкий лейкоцитоз, вероятно, он и являлся причиной гибели экспериментальных животных к 11 дню опыта.

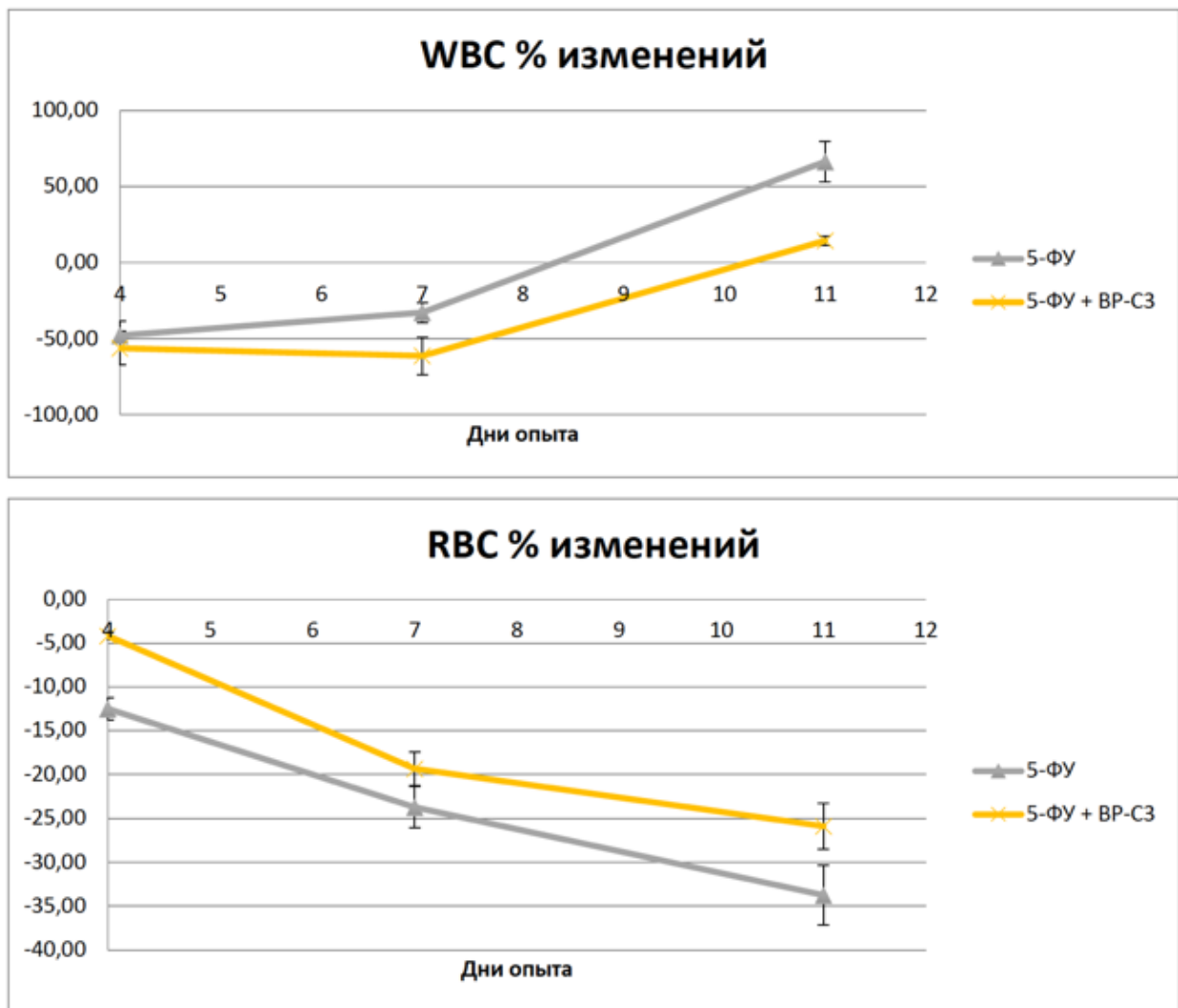


Рисунок 16 – Относительное содержание лейкоцитов (WBC) и эритроцитов (RBC) в крови мышей, получавших 5-фторурацил (5-ФУ), ВР-СЗ и филграстим (ФГ).

За 100% приняты значения в группах на 0 сутки до введения цитостатика

Для уточнения механизма защитного действия изучаемой композиции на кроветворную систему экспериментальных животных, получавших цитостатики, была оценена клеточность костного мозга мышей (Таблица 30). Глубина токсического поражения клеток костного мозга на 4 день опыта в целом предшествовала изменениям, наблюдавшимся в периферической крови. Применение ВР-СЗ значимо увеличивало клеточность костного мозга на 11 сутки наблюдения при использовании композиции в комбинации с 5-фторурацилом.

Таблица 30 – Количество миелокарицитов костного мозга ($\times 10^6$ /бедро) мышей разных групп, получавших 5-фторурацил или циклофосфамид

Группа	День опыта	
	4	11
Контроль интактный	21,4 \pm 2,2	23,1 \pm 2,1
5-ФУ (150 мг/кг)	1,2 \pm 0,2 ***	14,2 \pm 1,1 **
5-ФУ (150 мг/кг) + ВР-СЗ (75 мг/кг)	1,4 \pm 0,4 ***	17,5 \pm 1,1 *#
ЦФ (300 мг/кг)	2,1 \pm 0,7 ***	19,8 \pm 1,5
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-СЗ (75 мг/кг)	3,1 \pm 0,5 ***	21,2 \pm 2,0
ЦФ (300 мг/кг) + Филграстим (20мг/кг)	7,1 \pm 2,0 ***	–
ВР-СЗ (75 мг/кг)	22,5 \pm 1,9	22,9 \pm 2,2
Примечание – * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой, # – $p < 0,05$, по сравнению с группой 5-ФУ (критерий Стьюдента, данные приведены в виде $M \pm СКО$).		

Аналогично действовал и препарат сравнения – филграстим, который на 4 день опыта обеспечивал максимальную стимуляцию миелокарицитов (клеточность костного мозга превышала таковую для группы с монотерапией циклофосфаном в 3,4 раза), в то время как эффект ВР-СЗ был более сдержанным и выражался в увеличении клеточности в 1,5 раза по сравнению с соответствующим контролем.

Данные по массе селезенки экспериментальных животных представлены ниже (Таблица 31).

Таблица 31 – Масса селезенки (мг) мышей разных групп, получавших 5-фторурацил или циклофосфамид

Группа	День опыта	
	4	11
Контроль интактный	115,9±9,3	121,4±9,4
5-ФУ (150 мг/кг)	46,4±4,1 ***	147,8±22,5
5-ФУ (150 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	74,4±8,8 ** #	168,0±33,7
ЦФ (300 мг/кг)	29,7±0,3 ***	32,9±1,2 ***
ЦФ (300 мг/кг) + ВР-С3 (75 мг/кг)	49,0±6,6 *** &	174,0±20,0 &
ЦФ (300 мг/кг) + Филграстим (20мг/кг)	42,0±6,9 ***	–
ВР-С3 (75 мг/кг)	113,0±13,9	100,6±2,2
Примечание – ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой (критерий Стьюдента), # – $p < 0,05$ по сравнению с группой 5-ФУ, & – $p < 0,05$ по сравнению с группой ЦФ, данные приведены в виде $M \pm СКО$.		

В целом, паттерн воздействия препаратов химиотерапии и ВР-С3 на массу селезенки соответствует таковому для показателей периферической крови и костного мозга. Исследуемая композиция сопроводительной терапии при ее использовании в комбинации с циклофосфамидом и 5-фторурацилом способствовала сохранению исходной массы селезенки экспериментальных животных на 4 день опыта (Рисунок 17, Таблица 31) и вызывала ее увеличение по сравнению с контролем на 11 день опыта (Таблица 31).

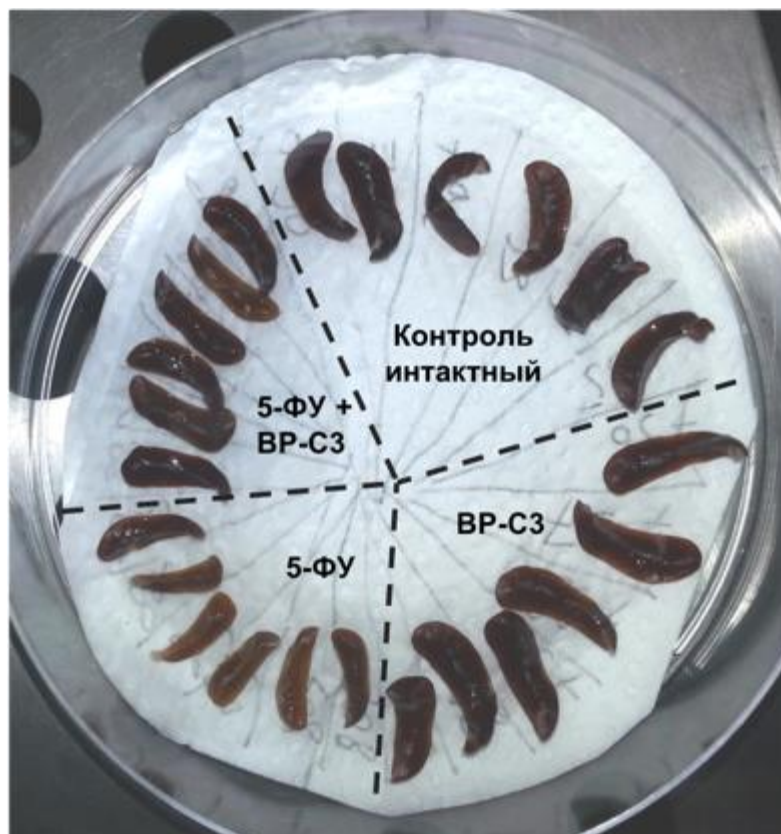


Рисунок 17 – Макрофотография препаратов селезенок мышей на 4 сутки после введения 5-ФУ

3.3.2. Исследование влияния режима введения композиции ВР-С3 на модели 5-ФУ индуцированной миелосупрессии при введении по лечебной и лечебно-профилактической схеме

Исследование проведено на 105 самцах мышей линии SHR, включенных в следующие группы: 1) интактный контроль, 2) контроль с 5-ФУ (150 мг/кг однократно внутривенно в день 0); 3) лечебно-профилактический режим ВР-С3 (80 мг/кг с -7 суток до введения цитостатика и до 11 суток) + 5-ФУ; 4) лечебный режим ВР-С3 (80 мг/кг с 1 суток после введения цитостатика и до 19 суток) + 5-ФУ; 5) контроль с ВР-С3 80 мг/кг с -7 суток до 11 суток опыта.

Выживаемость животных, подвергшихся воздействию 5-ФУ.

Оценка выживаемости не входила в рамки исследования, однако среди мышей наблюдалась небольшая смертность, свидетельствующая о том, что 5-ФУ оказывал токсическое действие (Таблица 32). На 7-й день 6 экспериментальных животных погибли во 2-й группе (группа, получавшая только 5-ФУ). Смертность в группе 2 была значительно выше, чем в контрольной группе (29% в группе 2 против 0% в контрольной группе; $P < 0,05$; Таблица 32).

Таблица 32 – Смертность мышей разных групп в ходе эксперимента при введении 5-ФУ

Группа	День эксперимента			Гибель, %
	4	11	20	
1 Контроль	0 (5)	0 (5)	0 (11)	0
2 5-ФУ	0 (5)	6 ^a (5)	0 (5)	29 ^c
3 ВР-С3 + 5-ФУ + ВР-С3	0 (5)	1 ^a (5)	5 ^b (5)	29 ^c
4 5-ФУ + ВР-С3	0 (5)	1 ^a (5)	0 (10)	5 ^d
5 ВР-С3	0 (5)	0 (5)	0 (11)	0

Примечания

1 Данные в таблице означают: число погибших мышей (число животных, подвергаемых эвтаназии по протоколу опыта; n=21). ^a – Гибель животных была внезапной, без достижения клинически значимых симптомов; ^b – 2 мыши погибли и 3 были подвергнуты эвтаназии в состоянии крайней слабости.

2 ^c – $P < 0,05$ по сравнению с контролем, ^d – $P = 0,093$ по сравнению с группой 5-ФУ (точный критерий Фишера).

Максимальное снижение массы тела шести животных, погибших во 2-й группе, составило 3-16%. В связи с этим остальных мышей взвешивали и далее животных с потерей массы тела $> 15\%$ (всего 6 животных) взвешивали каждый день. В группе 3 двух мышей с 20% снижением массы и одну с 12% потерей массы тела, подвергли эвтаназии в состоянии крайней слабости. Кроме того, три мыши

были найдены мертвыми с потерей массы тела 17-20% и отсутствием клинических проявлений при предыдущем осмотре. В группе с лечебно-профилактическим использованием ВР-СЗ (группа 3) смертность мышей составила 29%. Однако, в группе 3 гибель животных происходила на 1–11 дней позже, чем в группе 2. Смертность в группе 4 с терапевтической схемой применения ВР-СЗ (через 24 ч после введения 5-ФУ) была снижена до 5% (1 мышь с потерей веса на 17% умерла на 8 день; $P = 0,093$ по сравнению с группой 2; Таблица 32).

Энтерит был идентифицирован как основное макроскопическое изменение у всех погибших животных.

Динамика массы тела животных.

Токсическое действие 5-ФУ проявлялось в снижении массы тела животных (средняя потеря 7% на 4-й день). Не было значительных различий в средней массе тела животных, получавших только 5-ФУ, и животных, получавших комбинацию 5-ФУ и ВР-СЗ (Таблица 33). Потеря массы тела является одним из общих признаков токсичности и обычно составляет ~10% в исследованиях на животных, оценивающих цитостатические агенты, такие как 5-ФУ [125]. Максимальная потеря массы тела, зарегистрированная у отдельных мышей на 4-й день, составляла -16, -11 и -10% от начальной массы тела в группе 5-ФУ (группа 2), ВР-СЗ + 5-ФУ + ВР-СЗ (группа 3) и 5-ФУ + ВР-СЗ (группа 4), соответственно. Средняя потеря массы тела была преходящей, и к 11 дню статистически значимых различий между экспериментальными группами не наблюдалось.

Соотношение массы орган/тело животных.

Для оценки органоспецифического токсического действия 5-ФУ определяли и анализировали соотношения вес органа / тело для селезенки, тимуса, сердца, печени и почек (Таблица 34).

Таблица 33 – Средняя масса тела (г) мышей разных групп в ходе эксперимента при введении 5-ФУ

Группа	Сутки опыта			
	0	4	11	20
1. Контроль	31,7±0,5	32,3±0,7	32,1±0,6	32,6±0,6
2. 5-ФУ	32,5±0,4	30,1±0,6 ^{a,b}	32,6±0,5	33,8±0,6
3. ВР-СЗ + 5-ФУ + ВР-СЗ	32,0±0,5	30,4±0,5 ^b	31,2±0,6	32,6±0,7
4. 5-ФУ + ВР-СЗ	31,9±0,3	30,1±0,4 ^{a,b}	32,1±0,6	33,3±0,2
5. ВР-СЗ	32,3±0,5	32,6±0,5	32,6±0,5	32,8±0,5

Примечание – ^a – P<0,05 по сравнению с контролем в тот же день; ^b – P<0,05 по сравнению с группой ВР-СЗ в тот же день (данные представлены в виде M±m, обработаны с применением метода двухстороннего анализа ANOVA).

Селезенка и вилочковая железа были главными органами, в отношении которых 5-ФУ оказывал токсический эффект. Токсический эффект маркировался значительным снижением соотношения массы органа к массе тела на 4-й день после введения 5-ФУ по сравнению со значениями, которые наблюдались в контрольной группе (P <0,05). Использование ВР-СЗ в терапевтическом режиме (группа 4) и лечебно-профилактическом режиме (группа 3) защищало от токсического действия 5-ФУ на органы лимфопоэза (Таблица 34).

К 20 дню наблюдалось значительное увеличение веса селезенки во всех группах, которые получали 5-ФУ, по сравнению с таковым в контрольной группе (P<0,05; Таблица 34А). Введение ВР-СЗ в лечебном режиме повлияло на этот процесс. Так, к 11 дню отношение массы селезенки к массе тела у животных, получавших ВР-СЗ по терапевтическому режиму было значительно больше, чем в остальных группах.

Таблица 34 – Весовые коэффициенты орган/тело у мышей разных групп при введении 5-ФУ

А. Селезенка			
Группа	Соотношение веса орган/тело (мг/10 г) на экспериментальный день		
	4	11	20
1 Контроль	36,4±3,0	38,4±2,8	37,1±5,4
2 5-ФУ	16,6±1,6 ^a	45,1±6,7 ^b	89,0±5,0 ^{a,c}
3 ВР-СЗ + 5-ФУ + ВР-СЗ	23,9±2,7	55,0±10,3 ^{b,c}	95,0±2,8 ^{a,c}
4 5-ФУ + ВР-СЗ	36,3±2,0	92,9±9,8 ^{a,c}	80,8±5,2 ^{a,c}
5 ВР-СЗ	35,9±5,1	30,8±0,7	35,4±1,8
Б. Тимус			
Группа	Соотношение веса орган/тело (мг/10 г) на экспериментальный день		
	4	11	20
1 Контроль	22,3±2,8	22,2±1,5	20,6±0,7
2 5-ФУ	14,0±1,1 ^a	18,4±2,4	20,4±1,6
3 ВР-СЗ + 5-ФУ + ВР-СЗ	18,9±3,8	21,0±1,5	21,2±2,3
4 5-ФУ + ВР-СЗ	16,2±1,1	15,9±1,2	17,2±1,2
5 ВР-СЗ	19,5±2,6	22,6±1,5	21,0±1,0
В. Сердце			
Группа	Соотношение веса орган/тело (мг/10 г) на экспериментальный день		
	4	11	20
1 Контроль	66,2±9,0	66,1±6,7	64,6±3,9
2 5-ФУ	63,1±4,3	52,6±2,6	56,2±1,4
3 ВР-СЗ + 5-ФУ + ВР-СЗ	56,9±3,6	64,9±9,1	57,9±2,2
4 5-ФУ + ВР-СЗ	55,1±2,6	64,2±5,3	55,8±2,7
5 ВР-СЗ	66,9±6,6	60,7±4,1	60,6±2,6
Г. Печень			
Группа	Соотношение веса орган/тело (мг/10 г) на экспериментальный день		
	4	11	20
1 Контроль	594,4±54,7	605,2±47,0	541,5±19,1
2 5-ФУ	475,7±13,8	472,0±26,6	509,6±26,2
3 ВР-СЗ + 5-ФУ + ВР-СЗ	595,8±24,4	545,3±40,1	576,1±30,4
4 5-ФУ + ВР-СЗ	540,7±39,1	590,9±48,1	511,2±33,7
5 ВР-СЗ	600,8±69,9	541,9±31,4	552,3±36,0

Таблица 34 (продолжение).

Д. Почка (левая)			
Группа	Соотношение веса орган/тело (мг/10 г) на экспериментальный день		
	4	11	20
1 Контроль	83,1±7,7	89,6±8,5	77,8±3,7
2 5-ФУ	88,2±8,9	80,6±6,0	69,3±6,1
3 ВР-СЗ + 5-ФУ + ВР-СЗ	79,4±3,4	86,1±2,7	71,8±3,8
4 5-ФУ + ВР-СЗ	75,4±5,4	71,0±3,7	67,1±3,0
5 ВР-СЗ	79,4±3,4	86,1±2,7	71,8±3,8

Примечание – ^a – P<0,05 по сравнению с контрольной группой в тот же день; ^b – P<0,05 по сравнению с группой 5-ФУ + ВР-СЗ в тот же день; ^c – P<0,05 по сравнению с группой ВР-СЗ в тот же день (данные представлены в виде M±m, обработаны с применением метода двухстороннего анализа ANOVA).

Влияние ВР-СЗ на гематологическую токсичность, вызванную 5-ФУ.

Была оценена модификация миелотоксического эффекта 5-ФУ при одновременном введении ВР-СЗ в различных режимах (Рисунок 18).

Использование ВР-СЗ не влияло на степень подавления 5-ФУ гемопоэза в костном мозге, которое наблюдалось на 4-й день. Однако во время фазы восстановления гемопоэза наблюдались различия в эффектах при применении ВР-СЗ в терапевтическом и лечебно-терапевтическом режимах. На 11-й день значительно меньше миелокариоцитов наблюдалось в группе 4 по сравнению с группой 2 (P<0,05) и группой 3 (P<0,01). Однако на 20-й день количество миелокариоцитов в группе 4 было значительно выше по сравнению с группой 2 (P<0,05) и группой 3 (P<0,01).

При анализе гемограмм были отмечены следующие изменения (Таблица 35): у мышей в группах 2, 3 и 4, в которых все животные получили 5-ФУ, на 4 и 7 дни наблюдалась выраженная лейкопения, которая сменилась лейкоцитозом в группах 2 и 3 к 14-17 дням опыта; однако подобная картина не наблюдалась в группе 4. Изменения в популяциях лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов были сходными.

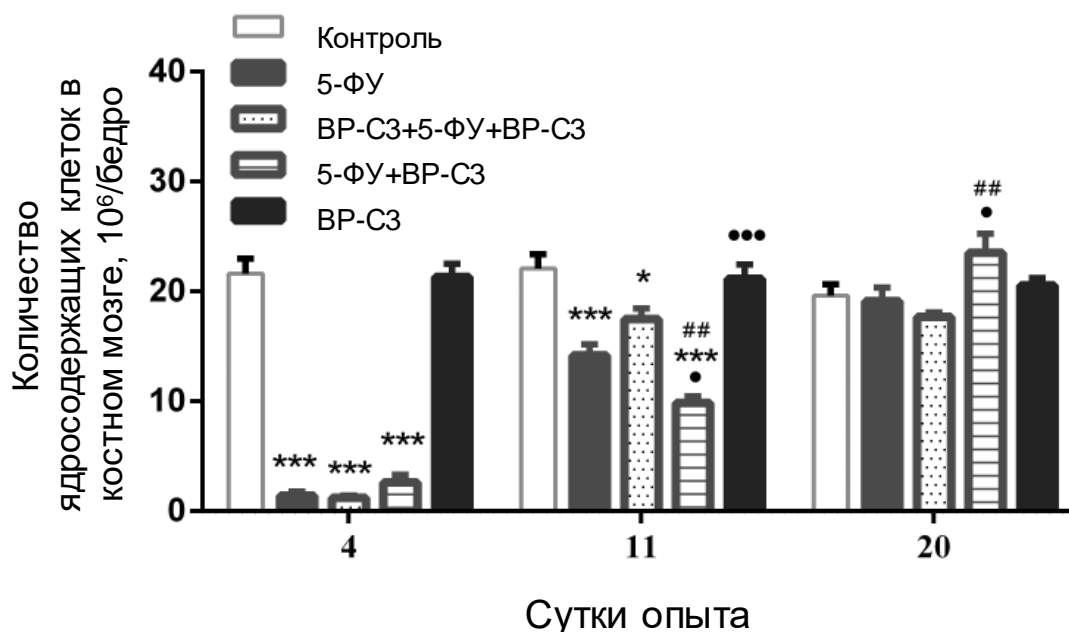


Рисунок 18 – Количество ядросодержащих клеток костного мозга у мышей линии SHR разных групп под воздействием 5-ФУ в дозе 150 мг/кг. Данные представлены в виде $M \pm m$. * – $P < 0,05$ и *** – $P < 0,001$ по сравнению с контрольной группой; ## – $P < 0,01$ по сравнению с группой BP-C3+5-ФУ+BP-C3; • – $P < 0,05$ и ••• – $P < 0,001$ по сравнению с группой 5-ФУ

Количество лимфоцитов на 4-й день в группе 2 было на 55% ниже, чем в контрольной группе ($P < 0,05$; Таблица 35А). К 7 дню количество лимфоцитов в группе 2 нормализовалось. Хотя количество лимфоцитов во 2-й группе было на 38% ниже по сравнению с контрольной группой на 7-й день, значительных различий выявлено не было. На 14-й день количество лимфоцитов в группе 2 значительно увеличилось на 228% ($P < 0,05$) по сравнению с контрольной группой, после чего к 20-му дню снизилось до нормального уровня. Количество лимфоцитов в группе 3 было меньше на 53% на 4-й день и на 70% в 7-й день по сравнению с контрольной группой в соответствующие сутки опыта ($P < 0,05$ на оба срока), и, таким образом, лимфопения длилась дольше, чем в группе 2. На 14 и 17 день количество лимфоцитов в группе 3 значительно увеличилось, на 148 и 167% соответственно ($P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой). В группе 4 количество лимфоцитов снизилось на 60% на 4-й день и на 69% на 7-й день (в оба

срока $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой). В отличие от групп 2 и 3, в группе 4 не наблюдалось увеличения количества лимфоцитов в более поздние сроки опыта (между 14 и 20 днем).

В группах 2, 3 и 4 количество гранулоцитов (Таблица 35Б) уменьшилось на ~80% на 4 день ($P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой). Снижение количества гранулоцитов на ~90% было наиболее выраженным в группах 2, 3 и 4 на 7 день ($P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой). Различия между группами 2, 3 и 4 не были статистически значимыми на 7-й день. В более поздние сроки опыта количество гранулоцитов значительно увеличилось в группе 2 к 17 дню ($P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой) и в группе 3 к 14 и 17 суткам (для всех сроков $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой). В группе 4 не наблюдалось увеличения количества гранулоцитов на 14 и 17 день по сравнению с контрольной группой.

Количество моноцитов значительно уменьшилось на 4 и 11 день после воздействия 5-ФУ в группах 2, 3 и 4 (для всех групп $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; Таблица 35В). В более поздние сроки опыта количество моноцитов значительно увеличилось, на 14 и 17 день в группе 2 и на 14–20 день в группе 3 ($P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой). В 4-й группе значительное увеличение количества моноцитов наблюдалось только на 14-й день ($p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой) и нормализовалось к 17-му дню. В 4-й группе восстановление лейкопоза без выраженной стадии усиленного гематологического ответа может быть связано с противовоспалительным действием ВР-СЗ, вероятно, из-за более короткой провоспалительной реакции моноцитов. Введение ВР-СЗ без 5-ФУ не оказывало влияния на дифференцировку лейкоцитов у мышей.

Легкая анемия развилась у мышей в группе 2 между 7 и 11 днями и в группе 3 между 11 и 14 днями (для всех случаев $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; Таблица 35Г). При введении ВР-СЗ мышам через 24 ч после 5-ФУ (группа 4) анемия не развивалась. Таким образом, режим введения ВР-СЗ оказывает различное влияние на гематологические параметры кроветворных органов и периферической крови.

Таблица 35 – Показатели гемограммы у мышей разных групп при введении 5-ФУ на разных сроках опыта

А. Лимфоциты, 10 ⁹ /л							
Группа	День эксперимента						
	0	4	7	11	14	17	20
1 Контроль	5,99±0,94	6,18±0,55	8,08±0,76	6,40±0,99	6,71±0,55	6,77±1,07	5,44±0,65
2 5-ФУ	5,61±0,65	2,79±0,37 ^{a,b}	5,02±1,17	10,60±1,24	22,02±5,94 ^{a,b}	13,54±3,50 ^b	7,72±3,24
3 ВР-С3 + 5-ФУ + ВР-С3	5,96±0,69	2,90±0,48 ^{a,b}	2,45±0,49 ^{a,b}	7,51±1,31	16,63±3,15 ^{a-} c	18,18±3,95 ^{a,b}	10,06±0,97
4 5-ФУ + ВР-С3	6,07±0,52	2,48±0,15 ^a	2,52±0,38 ^{a,b}	6,87±1,98	8,68±1,30	11,64±1,41	5,94±2,27
5 ВР-С3	5,61±1,03	5,82±0,75	6,50±0,59	5,70±0,81	5,43±1,47	4,10±0,65	4,03±1,19
Б. Гранулоциты, 10 ⁹ /л							
Группа	День эксперимента						
	0	4	7	11	14	17	20
1 Контроль	4,88±0,37	4,44±0,29	4,71±0,84	3,97±0,41	4,54±0,60	4,39±0,96	4,20±0,64
2 5-ФУ	4,29±0,35	1,95±0,27 ^{a,b}	0,58±0,13 ^{a,b}	3,65±0,63	12,04±2,75	16,98±7,93 ^{a,b}	8,74±2,09
3 ВР-С3 + 5-ФУ + ВР-С3	4,14±0,30	1,46±0,15 ^{a,b}	0,41±0,09 ^{a,b}	3,84±0,61	21,00±6,93 ^{a-} c	19,54±8,25 ^{a-} c	9,34±1,83
4 5-ФУ + ВР-С3	4,22±0,59	1,08±0,28 ^{a,b}	0,40±0,06 ^{a,b}	3,68±1,17	7,58±0,85	8,44±1,00	5,44±0,87
5 ВР-С3	3,80±0,42	3,32±0,24	3,82±0,65	3,57±0,34	3,73±0,38	2,88±0,51	2,45±0,34
В. Моноциты, 10 ⁹ /л							
Группа	День эксперимента						
	0	4	7	11	14	17	20
1 Контроль	0,58±0,04	0,63±0,08	0,64±0,13	0,52±0,06	0,51±0,09	0,54±0,12	0,60±0,12
2 5-ФУ	0,47±0,04	0,19±0,03 ^{a,b}	0,15±0,03 ^{a,b}	0,60±0,21	2,26±0,22 ^{a-c}	1,58±0,36 ^{a,b}	0,94±0,22
3 ВР-С3 + 5-ФУ + ВР-С3	0,44±0,04	0,16±0,03 ^{a,b}	0,11±0,03 ^{a,b}	0,79±0,11	2,37±0,39 ^{a-c}	2,07±0,30 ^{a-c}	1,46±0,15 ^{a-} c
4 5-ФУ + ВР-С3	0,38±0,07	0,12±0,04 ^{a,b}	0,10±0,03 ^{a,b}	0,74±0,23	1,38±0,17 ^{a,b}	0,98±0,26	0,48±0,09
5 ВР-С3	0,43±0,06	0,44±0,04	0,52±0,10	0,43±0,04	0,40±0,04	0,50±0,20	0,25±0,06

Таблица 35 (продолжение)

Группа	Г. Эритроциты, $10^{12}/л$						
	День эксперимента						
	0	4	7	11	14	17	20
1 Контроль	10,7±0,3	10,4±0,2	10,6±0,3	10,5±0,2	9,9±0,4	10,0±0,3	9,9±0,2
2 5-ФУ	11,0±0,3	10,7±0,3	8,9±0,5 ^{a-c}	8,5±0,5 ^{a,b}	9,5±0,3	10,2±0,4	10,5±0,4
3 ВР-СЗ + 5-ФУ + ВР-СЗ	11,1±0,2	10,7±0,4	9,5±0,4	8,1±0,2 ^{a,b}	8,4±0,2 ^{a,b}	9,4±0,1	9,8±0,4
4 5-ФУ + ВР-СЗ	11,4±0,3	11,4±0,3	10,5±0,4	9,4±0,8	8,8±0,3	9,5±0,2	9,2±0,3
5 ВР-СЗ	10,7±0,2	10,3±0,2	10,7±0,3	10,7±0,3	10,5±0,3	10,7±0,3	10,7±0,1

Примечание – ^a – $P < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в тот же день; ^b – $P < 0,05$ по сравнению с группой ВР-СЗ в тот же день; ^c – $P < 0,05$ по сравнению с группой 5-ФУ + ВР-СЗ в тот же день (данные представлены в виде $M \pm m$, обработаны с применением метода двухстороннего анализа ANOVA).

Влияние ВР-СЗ на развитие мукозита, вызванного 5-ФУ.

Поскольку одним из основных проявлений токсического действия 5-ФУ является энтерит, было оценено количество выживших крипт тощей кишки после воздействия 5-ФУ.

Гистологическое исследование образцов, полученных на 4-й день от всех мышей, получавших 5-ФУ, выявило гибель крипт, укорочение или потерю ворсин и хронический воспалительный ответ в слизистой оболочке кишечника (Рисунок 19 А, Б, В). Количество жизнеспособных крипт на поперечный срез кишечника значительно уменьшилось в группе 2 ($P < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, Рисунок 19 Г).

Напротив, ВР-СЗ способствовал сохранению жизнеспособности кишечных крипт при введении либо по лечебно-профилактической (группа 3; $P < 0,05$ по сравнению с группой 2), либо по терапевтической (группа 4; $P < 0,01$ по сравнению с группой 2) схеме. Введение только ВР-СЗ (группа 5) не влияло на количество жизнеспособных кишечных крипт. Таким образом, ВР-СЗ оказывает выраженное защитное действие в отношении эпителия тонкой кишки от повреждений, вызванных 5-ФУ.

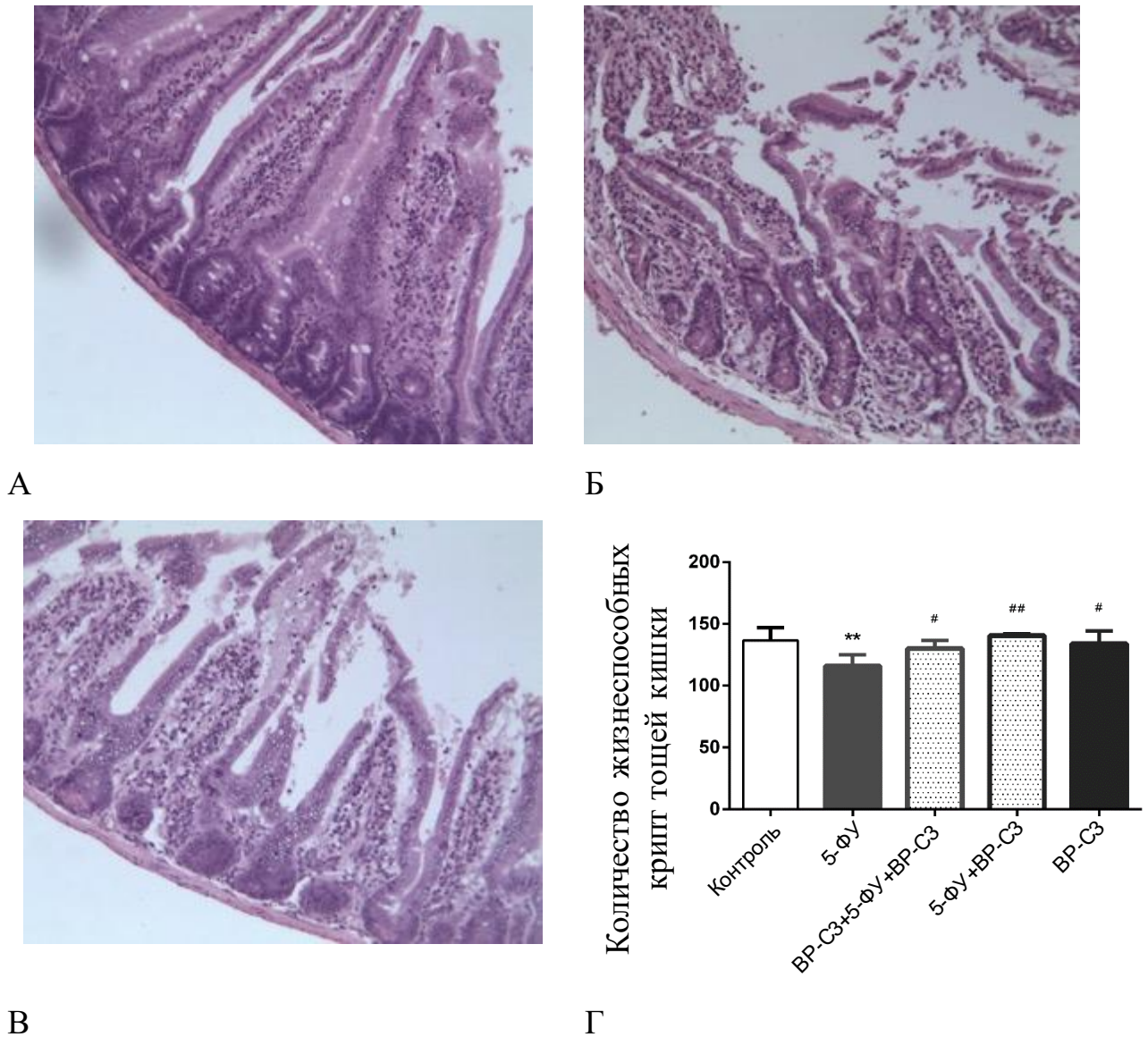


Рисунок 19 – Микрофотографии гистологических препаратов тощей кишки мыши (гематоксилин-эозин, $\times 400$), А – интактное животное, Б – животное, получившее 5-ФУ, наблюдаются гибель части крипт, укорочение или потеря ворсинок, хроническая воспалительная реакция в слизистой оболочке кишки, В – животное, получавшее комбинацию 5-ФУ+BP-C3. Г – количество жизнеспособных крипт тощей кишки в опытных группах на 4-й день после введения 5-ФУ. Данные представлены в виде $M \pm m$. ** – $P < 0,01$ по сравнению с контролем; # – $P < 0,05$ и ## – $P < 0,01$ по сравнению с группой 5-ФУ

3.3.1. Определение антиоксидантной емкости ВР-С3 и ВР-С2 и антиоксидантной активности ВР-С3 у мышей BALB/c при введении 5-ФУ

В результате пятикратного введения 5-фторурацила (1 раз в день по 50 мг/кг внутривенно) масса тела экспериментальных животных в двух группах, получавших цитостатик, существенно (до 20-25%) снижалась по сравнению со значениями показателя у контрольных животных (Таблица 36). Это снижение достигало уровня статистической значимости на 5 день опыта в группе, получавшей только цитостатик, и на 6 день – в группе, получавшей комбинацию препаратов.

Таблица 36 – Масса тела (г) мышей разных групп, получавших 5-фторурацил, с учетом срока опыта

Группы	День опыта							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Контроль интактный	26,2± 0,8	26,7± 0,9	26,7± 0,9	26,5± 1,0	26,5± 0,9	26,7± 0,9	26,6± 1,0	26,5± 1,1
Контроль внутрижелуд очного введения	26,8± 0,3	26,7± 0,3	26,5± 0,3	26,4± 0,3	26,4± 0,3	26,5± 0,3	26,5± 0,5	26,6± 0,5
5-ФУ	27,1± 0,3	26,9± 0,3	26,4± 0,3	25,1± 0,3	23,7± 0,3 *	22,8± 0,3 *	21,9± 0,5 *	20,5± 0,1 *
5-ФУ+ВР-С3	27,8± 0,5	27,6± 0,5	27,4± 0,5	26,1± 0,5	24,6± 0,4	23,7± 0,2 *	22,9± 0,2 *	22,4± 0,3 *
Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем введения.								

Основной причиной снижения массы тела экспериментальных животных была диарея (Таблица 37), серьезные степени которой наблюдались у животных,

получавших 5-фторурацил, начиная с 4 дня опыта. Небольшие нарушения стула, которые отмечались в течение первых 3 суток от введения препаратов или плацебо у всех животных, с которыми проводили манипуляции (группы 2-4), могут быть вызваны повышенным уровнем стресса.

Таблица 37 – Степень тяжести диареи (баллы) у мышей разных групп, получавших 5-фторурацил, с учетом срока опыта

Группы	День опыта							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Контроль интактный	0,0±	0,0±	0,0±	0,0±	0,0±	0,0±	0,0±	0,0±
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Контроль внутрижелудочного введения	0,8±	0,4±	0,4±	0,3±	0,1±	0,2±	0,0±	0,0±
	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0
5-ФУ	0,8±	0,1±	0,2±	1,2±	1,5±	2,3±	2,8±	2,8±
	0,3	0,1	0,1	0,2 *	0,2 *	0,3 *	0,2 *	0,2 *
5-ФУ+ВР-СЗ	0,3±	0,2±	0,1±	1,5±	1,9±	2,2±	2,7±	2,0±
	0,2	0,1	0,1	0,2 *	0,2 *	0,2 *	0,2 *	0,0 *
Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем введения.								

Исследуемая композиция в данном опыте не оказывала существенного воздействия на развитие и течение диареи у экспериментальных животных.

Использованная модель развития энтерита у мышей под влиянием 5-фторурацила не приводила к изменению супероксиддисмутазной активности экспериментальных животных (Таблица 38).

Таблица 38 – Супероксиддисмутазная активность лизата эритроцитов ($U/10^{12}$ эритроцитов) мышей разных групп, получавших 5-фторурацил, на 6 и 8 сутки после его введения

Сутки после введения 5-ФУ	Контроль	Контроль внутрижелудочного введения	5-ФУ	5-ФУ+ВР-С3
6	46,3±2,1	42,0±5,6	49,0±1,2	47,4±2,1
8	43,7±5,6	39,6±4,5	39,6±3,2	42,7±1,2

При многократном введении 5-ФУ пероксидазразрушающая активность в эритроцитах экспериментальных животных существенно снижается (различия достигают уровня статистической значимости на 8 день опыта) (Таблица 39). Использование композиции ВР-С3 нормализует значения данного показателя.

Таблица 39 – Пероксидазразрушающая активность лизата эритроцитов ($U/10^{12}$ эритроцитов) мышей разных групп, получавших 5-фторурацил, на 6 и 8 сутки после его введения

Сутки после введения 5-ФУ	Контроль	Контроль внутрижелудочного введения	5-ФУ	5-ФУ+ВР-С3
6	22,8±0,8	20,7 ±4,9	17,2±3,0	21,3±2,1
8	25,4±1,8	24,6±2,1	14,1±3,3 *	31,6±5,8
Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с остальными группами в данный срок наблюдения, данные приведены в виде $M \pm m$.				

Повышенное содержание ТБК-реактивных продуктов, к которым относится малоновый диальдегид (МДА), являющийся продуктом перекисного окисления липидов, часто используется в качестве индикатора оксидативного стресса. После пятикратного введения 5-ФУ значения данного показателя в группе животных,

получавшей только цитостатик, было на 50% выше, чем у контрольных животных (Таблица 40). Введение ВР-С3 способствовало нормализации содержания МДА.

Таблица 40 – Содержание МДА в лизате эритроцитов ($\text{нг}/10^{12}$ эритроцитов) мышей разных групп, получавших 5-фторурацил, на 8 сутки после его введения

Группа	Контроль	Контроль введения	5-ФУ	5-ФУ+ВР-С3
Содержание МДА	30,8±2,4	31,1±2,5	45,5±5,3 *	28,1±5,8
Примечание – * – $p < 0,05$ по сравнению с остальными группами в данный срок наблюдения, данные приведены в виде $M \pm m$.				

Таким образом, композиция ВР-С3 в данном опыте оказывала корректирующее влияние на нарушения антиоксидантной системы экспериментальных животных, вызванные введением 5-ФУ.

Для решения вопроса о том, может ли воздействие композиции на состояние антиоксидантной системы организма быть связано с прямым антиоксидантным действием, определялась относительная антиоксидантная емкость ВР-С3 в сравнении с аскорбиновой кислотой и дигидрохверцитином.

Антиоксидантная емкость эквимольных концентраций всех трех препаратов оказалась примерной равной. Относительная антиоксидантная емкость ВР-С3 в сравнении с аскорбиновой кислотой составила 0,98 и в сравнении с дигидрохверцитином – 0,89. При пересчете на массовую концентрацию, 1 г ВР-С3 по антиоксидантной активности в данном тесте оказался эквивалентен 126 мг аскорбиновой кислоты или 193 мг дигидрохверцитина.

При оценке композиции ВР-С2 было показано, что относительная антиокислительная емкость ВР-С2 сравнима с аскорбиновой кислотой и дигидрохверцитином при эквимольных концентрациях растворов и составляет 0,99 и 0,91, соответственно, но уступает им при пересчете на массовую концентрацию, так 1 г ВР-С2 по антиоксидантной активности в использованном тесте эквивалентен 124 мг аскорбиновой кислоты или 199 мг дигидрохверцитина.

3.3.2. Изучение воздействия ВР-СЗ на эффективность химиотерапевтического лечения на модели сарком мягких тканей, индуцированных бенз(а)пиреном у мышей

Оценка проведена на модели аутохтонных сарком мягких тканей, индуцированных подкожным введением бенз(а)пирена у мышей SHR обоего пола.

Циклофосфамид является наиболее широко применяемым алкилирующим средством для лечения гематологических злокачественных новообразований [133, 281] и солидных опухолей, особенно рака молочной железы в сочетании с антрациклин- или таксан-содержащих схемах химиотерпии [117, 296]. Основная токсичность циклофосфамида связана с подавлением кроветворной системы и в меньшей степени с влиянием на не гемопоэтические органы [97].

В исследование были включены следующие группы животных: 1 – контроль без введения цитостатиков (10 самцов и 9 самок); 2 – группа, получавшая циклофосфамид (200 мг/кг, внутривбрюшинно однократно) (7 самцов и 9 самок); 3 – группа, получавшая ВР-СЗ (75 мг/кг п/о, курсовое введения в течение 3 недель через 24 часа после циклофосфамида) (10 самцов и 10 самок); 4 – группа, получавшая циклофосфамид (200 мг/кг, в/б однократно) и ВР-СЗ (75 мг/кг п/о, курсовое введения в течение 3 недель через 24 часа после циклофосфамида) (10 самцов и 9 самок).

По результатам гистологического исследования все опухоли представляли собой полиморфно-клеточные саркомы, состоящие в основном из веретенообразных клеток и небольшого количества многоядерных клеток. Было оценено влияние гендерного фактора на рост опухоли, и, так как было установлено, что оно было значительным ($p=0,009$ след Пиллая, анализ MANCOVA), все результаты были проанализированы отдельно для самцов и самок.

Данные о динамике средней массы тела мышей-самцов приведены в таблице (Таблица 41).

У самцов мышей из групп 2 и 4, получавших циклофосфамид, наблюдалось приблизительно 10% снижение начальной величины средней массы тела между 4

и 7 днями (Таблица 41). Вес был стабильным в последующие сроки наблюдения. Средняя масса тела в контрольной группе и группе ВР-С3 увеличилась в течение периода наблюдения, вероятно, в основном из-за роста опухолей (Таблица 42, Рисунок 20).

Таблица 41 – Масса тела (г) мышей-самцов с саркомами мягких тканей, получавших циклофосфамид, на разных сроках опыта

Группа	Сутки опыта					
	0	4	7	12	17	21
1 Контроль	41,4±1,1	43,1±1,0	44,0±1,1	45,1±1,2	46,0±1,7	47,2±2,4
2 ЦФ, 200 мг/кг	39,3±1,0	37,5±0,9 ** #	37,0±1,2 *** ##	36,8±1,8 *** ###	37,6±2,0 *** ###	38,2±2,4 *** ###
3 ВР-С3, 75 мг/кг	42,2±0,9	41,2±1,6	41,9±1,8	44,1±1,6	45,9±1,5	46,7±1,4
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	41,3±0,8	37,3±0,9 ** #	37,7±0,7 *** ##	39,1±0,8 *** ##	39,4±0,7 *** ###	39,1±1,0 *** ###
Примечание – * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой Контроль; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ по сравнению с группой ВР-С3 (данные проанализированы двухсторонним дисперсионным анализом (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, $M \pm m$).						

Средний объем опухоли у мышей-самцов из контрольной группы постепенно увеличивался. Введение циклофосфамида привело к торможению роста опухоли на 69-85%, что было статистически значимым на 7-21 сутки опыта. Торможение роста опухоли на 44-45% был зафиксировано между 17 и 21 сутками в группе, получавшей только ВР-С3. Комбинированное введение циклофосфамида и ВР-С3 привело к торможению роста опухоли на 64-84%. Таким образом, добавление ВР-С3 к циклофосфамиду не обеспечивало аддитивного или синергетического эффекта у мышей-самцов.

Таблица 42 – Объем опухоли (см³) у мышей-самцов с саркомами мягких тканей, получавших циклофосфамид, на разных сроках опыта

Группа	n	Сутки опыта					
		0	4	7	12	17	21
1 Контроль	10	0,22±0,05	0,64±0,12	0,98±0,20	1,65±0,33	2,67±0,55	2,89±0,79
2 ЦФ, 200 мг/кг	9	0,25±0,08 (-11 %)	0,28±0,09 (56 %)	0,30±0,10 * (69 %)	0,29±0,10 *** # (83 %)	0,41±0,16 *** ## (85 %)	0,64±0,24 *** # (78 %)
3 ВР-С3, 75 мг/кг	10	0,31±0,13 (-42 %)	0,64±0,21 (1 %)	0,92±0,31 (6 %)	1,11±0,38 (33 %)	1,51±0,56 ** (44 %)	1,60±0,22 ** (45 %)
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	10	0,27±0,07 (-20 %)	0,37±0,08 (42 %)	0,35±0,08 * (64 %)	0,34±0,08 *** # (79 %)	0,43±0,13 *** ## (84 %)	0,53±0,14 *** ## (82 %)

Примечания

1 В скобках приведено торможение роста опухоли.

2 * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой Контроль.

– $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ по сравнению с группой ВР-С3 (данные проанализированы двухсторонним дисперсионным анализом (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, $M \pm m$).

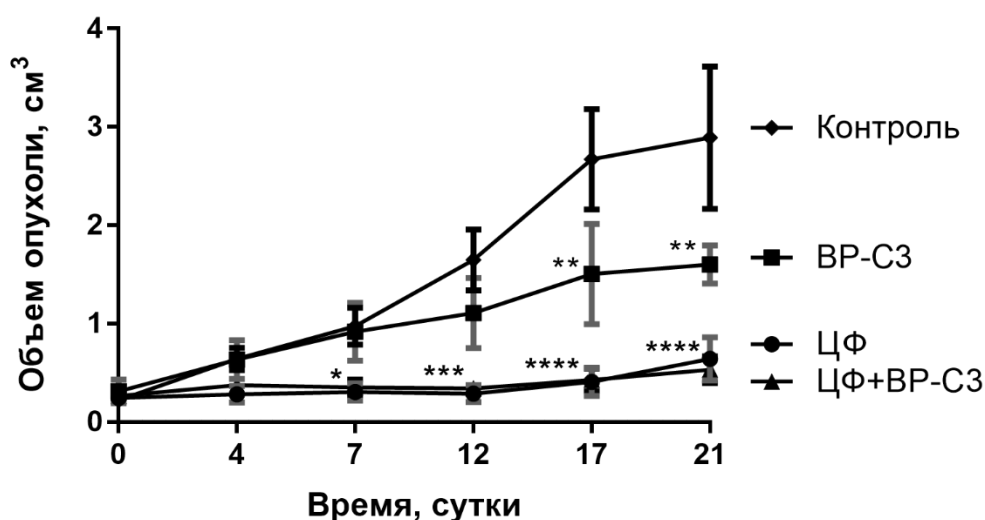


Рисунок 20 – Средний объем опухоли у мышей-самцов с саркомами мягких тканей разных групп, получавших циклофосфамид, в течение опыта.

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$ по сравнению с группой Контроль (данные приведены в виде $M \pm m$)

Данные о динамике средней массы тела мышей-самок приведены в таблице (Таблица 43).

Снижение средней массы тела до 11% от исходного значения было отмечено между 4 и 7 сутками опыта у самок мышей групп 2 и 4, получавших циклофосфамид. В последующем периоде наблюдения средняя масса тела мышей в этих группах была примерно на начальном уровне (Таблица 43). Увеличение средней массы тела в контрольной и ВР-С3 группах соответствовало росту объема опухоли (Таблица 44, Рисунок 21).

Таблица 43 – Масса тела (г) мышей-самок с саркомами мягких тканей, получавших циклофосфамид, на разных сроках опыта

Группа	Сутки опыта					
	0	4	7	12	17	21
1 Контроль	31,5±0,9	32,7±1,2	32,8±1,3	33,8±1,5	34,0±0,9	34,9±0,9
2 ЦФ, 200 мг/кг	31,7±0,9	29,9±1,0	28,7±0,8 ** #	29,7±0,6 ** #	29,8±0,6 ** #	30,0±1,2 ** ##
3 ВР-С3, 75 мг/кг	30,8±1,0	31,5±0,9	32,4±1,0	33,5±1,2	34,6±1,5	35,5±2,2
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	32,6±0,7	29,3±0,8 *	28,9±1,0 ** #	29,7±1,4 ** #	30,8±0,7 ** #	32,7±0,7

Примечание – * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой Контроль; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ по сравнению с группой ВР-С3 (данные проанализированы двухсторонним дисперсионным анализом (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, $M \pm m$).

Таблица 44 – Объем опухоли (см³) у мышей-самок с саркомами мягких тканей, получавших циклофосфамид, на разных сроках опыта

Группа	n	Сутки опыта					
		0	4	7	12	17	21
1 Контроль	11	0,26±0,05	0,65±0,13	0,95±0,22	1,61±0,48	1,63±0,41	2,42±0,62
2 ЦФ, 200 мг/кг	10	0,38±0,10 (-43 %)	0,39±0,10 (40 %)	0,43±0,10 (55 %)	0,41±0,12 ** ## (74 %)	0,49±0,11 ** ### (70 %)	1,01±0,33 *** ### (58 %)
3 ВР-С3, 75 мг/кг	11	0,36±0,08 (-36 %)	0,69±0,19 (-7 %)	0,98±0,27 (-2 %)	1,61±0,39 (0 %)	2,20±0,52 (-35 %)	2,70±0,62 (-11 %)
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	11	0,43±0,14 (-61 %)	0,50±0,14 (22 %)	0,42±0,11 (55 %)	0,51±0,11 ** ## (68 %)	0,72±0,13 * ### (56 %)	1,58±0,36 * ## (35 %)

Примечания

1 В скобках приведено торможение роста опухоли.

2 * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с группой Контроль.

– $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$ по сравнению с группой ВР-С3 (данные проанализированы двухсторонним дисперсионным анализом (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, $M \pm m$).

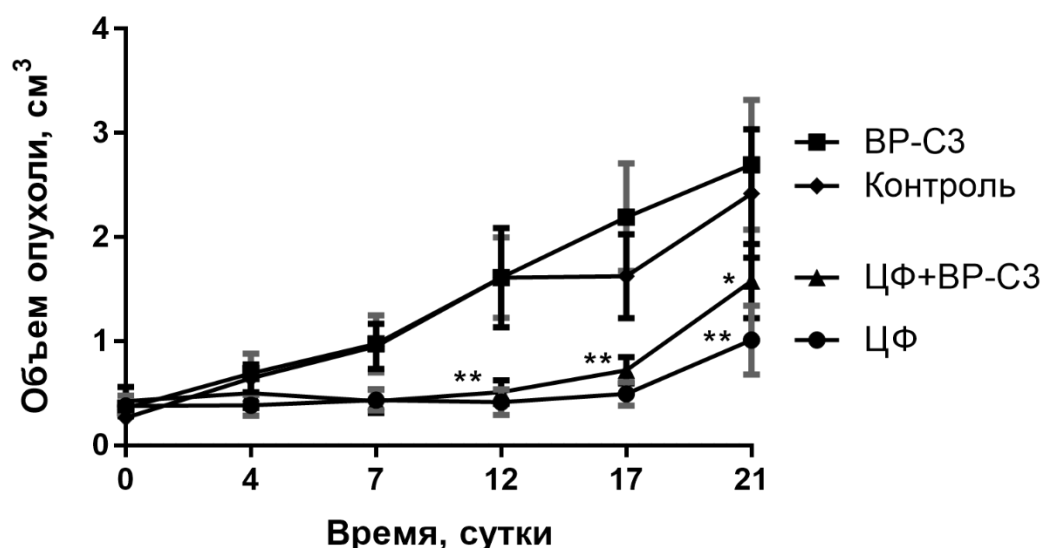


Рисунок 21 – Средний объем опухоли у мышей-самок с саркомами мягких тканей разных групп, получавших циклофосфамид, в течение опыта. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, по сравнению с группой Контроль (данные приведены в виде $M \pm m$)

Циклофосфамид, при введении мышам-самкам группы 2, приводил к торможению роста опухоли на 58-74%, и эффект был статистически значимым на 12-21 сутках. ВР-С3 не оказывал существенного влияния на скорость роста опухоли. Торможение роста опухоли на 35-68% с 12-21 сутки опыта (Таблица 44) наблюдалось у животных, получавших комбинацию ВР-С3 и циклофосфамида. Эффективность комбинации циклофосфамида с ВР-С3 и циклофосфамида была схожей. Значительно меньшее торможение роста опухоли было получено у самок мышей, по сравнению с самцами, которые получали только циклофосфамид.

Гематологическая токсичность циклофосфамида оценивалась по клиническому анализу периферической крови (Таблица 45 для мышей-самцов и Таблица 46 для мышей-самок). Развитие опухолей было ассоциировано с нарастанием лейкоцитоза, главным образом из-за увеличения количества гранулоцитов. Количество лейкоцитов у самцов мышей из контрольной группы увеличилось с $14,32 \pm 4,19 \times 10^9 / \text{л}$ на нулевые сутки опыта до $36,25 \pm 16,11 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$) на 21 сутки опыта. В течение того же периода количество гранулоцитов увеличилось с $7,64 \pm 3,91 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$) до $25,50 \pm 12,98 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$). Это увеличение указывает на развитие ассоциированной с опухолью хронической воспалительной реакции иммунной системы. Лечение мышей циклофосфамидом привело к значительному снижению количества лейкоцитов к 4-му дню ($2,43 \pm 1,77 \times 10^9 / \text{л}$, $p < 0,05$ против $12,70 \pm 4,69 \times 10^9 / \text{л}$ в нулевой день). Их уровень был восстановлен к 7 дню опыта ($17,14 \pm 11,98$) и оставался неизменным до 21 дня ($14,68 \pm 10,71 \times 10^9 / \text{л}$). Более низкий уровень лейкоцитов в группе лечения циклофосфамидом в конце исследования может быть объяснен значительным торможением роста опухоли и гораздо менее выраженной опухоль-ассоциированной воспалительной реакцией в этой группе по сравнению с контрольной группой. Интересно, что повышенные уровни как лейкоцитов ($15,77 \pm 11,28 \times 10^9 / \text{л}$ на нулевые сутки и $26,53 \pm 15,54 \times 10^9 / \text{л}$ на 21 сутки), так и гранулоцитов ($9,79 \pm 9,78 \times 10^9 / \text{л}$ на нулевые сутки, $19,30 \pm 12,00 \times 10^9 / \text{л}$ на 21 сутки) были зарегистрированы в группе ВР-С3 в течение периода наблюдения, однако изменения не достигли уровня статистической значимости по сравнению с

начальным уровнем или значениями в контрольной группе в те же сутки опыта. Изменения в количестве лейкоцитов и гранулоцитов, наблюдаемые в группе ВР-СЗ, можно объяснить торможением роста опухоли и / или иммуномодулирующей или противовоспалительной активностью этой полифенольной композиции.

У животных, получавших циклофосфамид, к 7-му дню развилась анемия (количество эритроцитов $6,6 \pm 1,7 \times 10^{12}$ / л), в более поздние сроки она сменялась эритроцитозом (количество эритроцитов $9,0 \pm 0,6 \times 10^{12}$ / л на 21-й день), превышая показатель количества эритроцитов в контрольной группе (количество эритроцитов $7,4 \pm 2,1 \times 10^{12}$ / л на 21 сутки, $p < 0,05$).

Количество тромбоцитов увеличилось в ответ на введение циклофосфамида с 7-го дня ($2867 \pm 936 \times 10^9$ / л, $p < 0,05$) до 21-го дня ($2002 \pm 988 \times 10^9$ / л) по сравнению с исходным значением на нулевой день опыта ($1324 \pm 327 \times 10^9$ / л).

Таблица 45 – Клинический анализ крови мышей-самцов с саркомами мягких тканей, получавших циклофосфамид, на разных сроках опыта

А. Лейкоциты, 10^9 /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	14,32±4,19	19,01±7,65	20,43±9,17	25,80±10,09 ^c	36,25±16,11 ^c
2 ЦФ, 200 мг/кг	12,70±4,69	2,43±1,77 ^{a b c}	17,14±11,98	18,62±8,81	14,68±10,71 ^a
3 ВР-СЗ, 75 мг/кг	15,77±11,28	15,13±9,54	16,56±12,28	14,98±4,13	26,53±15,54
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-СЗ, 75 мг/кг	16,87±4,00	1,10±0,55 ^{a b c}	17,33±17,44	14,19±9,81 ^a	12,27±5,75 ^{a b}
Б. Лимфоциты, 10^9 /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	6,12±1,95	6,33±2,14	5,81±3,42	6,54±1,35	9,50±3,77 ^c
2 ЦФ, 200 мг/кг	5,36±1,95	1,39±1,21 ^{a b c}	3,26±2,11 ^{a b}	5,60±2,70	3,95±3,06 ^a
3 ВР-СЗ, 75 мг/кг	5,43±2,16	5,38±2,50	4,86±2,79	3,88±0,50	6,43±3,48 ^a
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-СЗ, 75 мг/кг	6,34±2,02	0,73±0,25 ^{a b c}	2,69±1,77 ^{b c}	3,09±1,39 ^{a c}	2,63±1,06 ^{a b c}

Таблица 45 (продолжение).

В. Гранулоциты, 10 ⁹ /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	7,64±3,91	11,97±7,56	13,89±7,70	18,30±9,73 ^c	25,50±12,98 ^c
2 ЦФ, 200 мг/кг	6,71±3,00	0,90±0,68 ^{ab}	13,24±10,59	12,05±6,16	9,88±7,04 ^a
3 ВР-С3, 75 мг/кг	9,79±9,78	9,24±7,69	11,07±10,55	10,60±3,84	19,30±12,00
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	9,93±4,47	0,46±0,24 ^{abc}	13,98±15,20	10,43±8,22	9,08±4,86 ^{ab}
Г. Моноциты, 10 ⁹ /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	0,56±0,18	0,71±0,33	0,73±0,31	0,96±0,47	1,25±0,47 ^c
2 ЦФ, 200 мг/кг	0,63±0,36	0,14±0,14 ^{ac}	0,64±0,46	0,97±0,58	0,85±1,03
3 ВР-С3, 75 мг/кг	0,54±0,36	0,51±0,30	0,63±0,42	0,50±0,18	0,80±0,41
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	0,60±0,16	0,08±0,09 ^{abc}	0,66±0,58	0,68±0,44	0,56±0,35 ^a
Д. Эритроциты, 10 ¹² /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	9,0±1,0	8,2±2,1	8,0±1,7	8,7±1,2	7,4±2,1 ^c
2 ЦФ, 200 мг/кг	8,6±0,9	7,1±1,6 ^{bc}	6,6±1,7 ^{abc}	9,2±0,4	9,0±0,6 ^{ab}
3 ВР-С3, 75 мг/кг	8,7±1,1	8,9±1,7	8,7±1,1	8,7±0,5	6,9±1,2 ^c
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	8,9±0,9	7,7±1,1 ^c	7,1±1,2 ^{bc}	9,2±0,4	9,3±0,8 ^{ab}
Е. Тромбоциты, 10 ⁹ /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	1246±581	1164±909	1048±885	1309±1496	457±318
2 ЦФ, 200 мг/кг	1324±327	1166±373	2867±936 ^{abc}	3001±875 ^{abc}	2002±988 ^{ab}
3 ВР-С3, 75 мг/кг	1407±461	1594±720	1704±853	732±390	370±142 ^c
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	1292±473	1018±260	2752±808 ^{abc}	3292±690 ^{abc}	2213±997 ^{abc}
Примечание – ^a – p<0,05 по сравнению с контрольной группой, ^b – p<0,05 по сравнению с группой ВР-С3, ^c – p<0,05 по сравнению с 0 сутками опыта в той же группе (данные проанализированы двухсторонним дисперсионным анализом (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, M±СКО).					

Таблица 46 – Клинический анализ крови мышей-самок с саркомами мягких тканей, получавших циклофосфамид, на разных сроках опыта

А. Лейкоциты, 10 ⁹ /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	11,18±3,77	14,30±9,80	18,95±14,04	17,44±11,93	16,87±12,71
2 ЦФ, 200 мг/кг	14,50±9,96	1,19±0,71 ^{abc}	13,70±12,92	16,12±11,62	10,83±5,75
3 ВР-С3, 75 мг/кг	12,46±6,90	10,68±4,44	10,87±4,79	17,64±9,87	17,18±8,93
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	13,53±7,99	1,29±0,71 ^{abc}	9,71±9,00 ^a	13,93±10,09	17,62±16,08
Б. Лимфоциты, 10 ⁹ /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	6,38±2,20	7,93±7,79	10,31±9,72	7,69±4,10	5,54±1,45
2 ЦФ, 200 мг/кг	7,15±4,87	0,91±0,29 ^{ac}	5,58±8,78 ^a	3,80±3,29	3,31±1,04
3 ВР-С3, 75 мг/кг	7,26±4,72	5,04±2,90	5,24±2,41 ^a	7,04±2,46	6,38±2,42
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	6,82±4,65	0,89±0,40 ^{ac}	3,93±5,62 ^a	3,31±2,44	6,02±8,71
В. Гранулоциты, 10 ⁹ /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	4,4±2,24	5,87±4,43	7,96±6,49	9,13±8,13	9,29±8,12
2 ЦФ, 200 мг/кг	6,67±5,25	0,33±0,31 ^c	7,57±4,41	11,53±8,56	7,01±5,18
3 ВР-С3, 75 мг/кг	4,76±2,79	5,24±2,50	5,19±2,97	9,93±7,61	10,08±7,07
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	6,19±4,79	0,44±0,34 ^{ac}	5,38±3,67	9,73±8,55	11,03±10,38
Г. Моноциты, 10 ⁹ /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	0,40±0,12	0,50±0,30	0,68±0,55	0,63±0,34	0,61±0,49
2 ЦФ, 200 мг/кг	0,68±0,65	0,06±0,11 ^{ac}	0,56±0,42	0,79±0,39	0,50±0,20
3 ВР-С3, 75 мг/кг	0,44±0,31	0,40±0,15	0,44±0,26	0,67±0,39	0,72±0,46
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	0,52±0,37	0,05±0,07 ^{ac}	0,40±0,16	0,89±0,85	0,57±0,43
Д. Эритроциты, 10 ¹² /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	9,5±0,7	8,3±2,1	8,0±2,2	8,9±1,2	8,5±1,6
2 ЦФ, 200 мг/кг	8,4±1,9	6,7±2,2 ^{abc}	5,9±2,2 ^{abc}	8,2±1,2	8,3±1,5
3 ВР-С3, 75 мг/кг	9,3±1,6	9,6±0,6	9,0±0,7	8,7±1,6	8,8±1,3
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-С3, 75 мг/кг	8,8±1,6	7,2±2,2 ^{bc}	7,4±2,1 ^b	8,7±0,7	7,9±1,7

Таблица 46 (продолжение)

Е. Тромбоциты, 10 ⁹ /л					
Группа	Сутки опыта				
	0	4	7	14	21
1 Контроль	1184±454	1056±475	940±553	1138±661	647±567
2 ЦФ, 200 мг/кг	1223±598	1152±631	2810±506 ^{a b c}	3204±773 ^{a b c}	1983±469 ^{a b c}
3 ВР-СЗ, 75 мг/кг	1272±467	1226±693	1037±427	932±523	1145±686
4 ЦФ, 200 мг/кг + ВР-СЗ, 75 мг/кг	1142±345	1179±479	2477±878 ^{a b c}	2498±1007 ^{a b c}	1957±984 ^{a b c}
Примечание – ^a – p<0,05 по сравнению с контрольной группой, ^b – p<0,05 по сравнению с группой ВР-СЗ, ^c – p<0,05 по сравнению с 0 сутками опыта в той же группе (данные проанализированы двухсторонним дисперсионным анализом (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, М±СКО.					

У самок мышей наблюдалась тенденция к увеличению количества лейкоцитов с $11,18 \pm 3,77 \times 10^9 / \text{л}$ на нулевые сутки до $16,87 \pm 12,71 \times 10^9 / \text{л}$ на 21 сутки опыта, что было связано с увеличением количества гранулоцитов ($4,4 \pm 2,24 \times 10^9 / \text{л}$ на нулевые сутки; $9,29 \pm 8,12 \times 10^9 / \text{л}$ на 21 сутки, $p < 0,05$). В группе, получавшей циклофосфамид, количество лейкоцитов значительно снизилось к 4 дню ($1,19 \pm 0,71 \times 10^9 / \text{л}$), но в более поздние сроки наблюдения ($10,83 \pm 5,75 \times 10^9 / \text{л}$ на 21-й день) оно не отличалось от исходного уровня и контрольной группы. У самок мышей введение циклофосфамида привело к развитию анемии между 4-м и 7-м днем опыта. В этой группе количество эритроцитов восстанавливалось к 14-му дню опыта. Количество тромбоцитов оставалось повышенным с 7-го по 21-й дни опыта.

Добавление ВР-СЗ к циклофосфамиду не изменяло гематологическую токсичность циклофосфамида, за исключением некоторого улучшения течения анемии, наблюдаемой как у самцов, так и у самок мышей, получавших циклофосфамид. Так, наиболее заметное снижение количества эритроцитов у мышей, получавших циклофосфамид, наблюдалось в 7 день опыта: $6,6 \pm 1,7 \times 10^{12} / \text{л}$ у мышей-самцов и $5,9 \pm 2,2 \times 10^{12} / \text{л}$ у мышей-самок. Количество эритроцитов, на 7 день опыта у животных, получавших комбинацию ВР-СЗ и циклофосфамида, составило $7,1 \pm 1,2 \times 10^{12} / \text{л}$ и $7,4 \pm 2,1 \times 10^{12} / \text{л}$ для самцов и

самок мышей, соответственно. Различия не достигли уровня статистической значимости.

Поскольку гематологическая токсичность циклофосфида была получена в отношении лейкоцитов периферической крови, мы изучили влияние циклофосфида и ВР-СЗ на субпопуляции лимфоцитов у мышей без опухолей. Учитывая, что противоопухолевый эффект ВР-СЗ был выявлен на мышцах-самцах, животных этого пола использовали для оценки влияния циклофосфида на субпопуляции лимфоцитов. Результаты исследования представлены в таблице (Таблица 47).

Введение циклофосфида вызывало заметное уменьшение субпопуляций лимфоцитов в периферической крови и увеличение соотношения $CD4^+ / CD8^+$. Несмотря на то, что количество лейкоцитов восстанавливается к 11 дню после его заметного снижения на 4-й день после введения циклофосфида, уровень В-лимфоцитов все еще остается сниженным (Таблица 47). ВР-СЗ не влиял на субпопуляции лимфоцитов периферической крови, за исключением количества клеток НКТ, число которых снизилось на 4-й день и было восстановлено к 11-му дню после введения циклофосфида.

Таблица 47 – Субпопуляции лимфоцитов в периферической крови самцов мышей SHR после введения циклофосфида и ВР-С3

Группа	Единицы измерения	Лейкоциты	Лимфоциты	Т-лимфоциты	В-лимфоциты	Т-хелперы CD4+	Т-цитотоксически лимфоциты CD8+	NK клетки	NKT клетки	CD4+ / CD8+
4 сутки после введения циклофосфида										
1 Контроль	#, 10 ⁹ /L	10,9±1,1	5,9±1,1	2,4±0,5	1,9±0,8	1,6±0,4	0,72±0,15	0,28±0,05	0,33±0,13	2,4±0,5
	%	—	53,0±6,2	38,9±2,6	43,0±3,0	25,5±2,5	12,6±2,6	6,0±2,1	5,2±1,6	
2 ЦФ, 300 мг/кг	#, 10 ⁹ /L	1,1±0,4 **	0,7±0,3 **	0,6±0,2 *	0,017±0,006 *	0,5±0,2 *	0,09±0,03 *	0,01±0,00	0,02±0,01 ***	5,9±0,2 *
	%	—	61,0±3,3	91,6±1,9***	3,6±1,8 ***	77,5±2,1 ***	13,0±0,5	1,9±0,7	2,7±0,3 *	
3 ВР-С3 75 мг/кг	#, 10 ⁹ /L	9,3±1,3	5,8±1,1	2,1±0,3	2,1±0,2	1,7±0,3	0,49±0,10	0,16±0,03	0,10±0,02 **	3,5±0,5
	%	—	61,0±3,1	38,9±4,4	51,3±4,7	29,2±2,3	9,2±1,8	3,0±0,6	1,5±0,3 **	
4 ЦФ, 300 мг/кг + ВР-С3 75 мг/кг	#, 10 ⁹ /L	1,2±0,3 **	0,8±0,2 **	0,7±0,1 *	0,004±0,002 *	0,6±0,1	0,08±0,02 *	0,01±0,00	0,02±0,00 ***	8,9±0,9 ***
	%	—	61,5±4,4	95,3±0,8 ***	1,0±0,5 ***	84,3±1,1 ***	9,9±1,1	1,1±0,1	2,4±0,5 *	

Таблица 47 (продолжение)

Группа	Единицы измерения	Лейкоциты	Лимфоциты	Т-лимфоциты	В-лимфоциты	Т-хелперы CD4+	Т-цитотоксические лимфоциты CD8+	NK клетки	NKT клетки	CD4+ / CD8+
11 сутки после введения циклофосфида										
1 Контроль	#, 10 ⁹ /L	8,3±1,4	4,9±1,0	2,6±0,3	2,7±0,6	1,6±0,1	0,98±0,30	0,15±0,05	0,09±0,02	2,1±0,4
	%	—	58,4±2,9	54,9±5,6	34,5±6,6	35,8±4,1	20,2±5,1	3,2±0,9	1,8±0,4	
2 ЦФ, 300 мг/кг	#, 10 ⁹ /L	10,7±2,8	2,9±1,0	1,7±0,5	0,042±0,033**	1,4±0,5	0,35±0,11*	0,67±0,35	0,09±0,03	4,6±0,9
	%	—	25,4±2,9**	62,4±3,1	0,7±0,2***	49,8±4,2**	12,3±2,1	19,1±3,1***	3,1±0,3	
3 ВР-С3 75 мг/кг	#, 10 ⁹ /L	8,4±0,9	4,9±0,5	2,3±0,3	3,1±0,8	1,7±0,1	0,63±0,14	0,07±0,01	0,06±0,01	3,5±1,0
	%	—	58,4±3,3	46,9±1,2	43,4±0,9	36,0±1,6	12,3±1,9	1,5±0,3	1,3±0,1	
4 ЦФ, 300 мг/кг + ВР-С3 75 мг/кг	#, 10 ⁹ /L	19,2±5,5**	4,0±1,2	2,7±0,7	0,008±0,004**	2,2±0,5	0,56±0,17	0,68±0,39	0,07±0,04	5,4±1,6*
	%	—	21,7±2,3**	70,9±3,9**	0,1±0,0***	59,2±5,9***	12,7±2,0	13,1±5,4**	1,6±0,6	
Примечание – * – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 по сравнению с группой Контроль (тест Крускала-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения, данные приведены в виде M±m).										

Митотическая активность опухолей, оцененная маркером PCNA, была высокой на 21-й день после начала опыта. Процент клеток PCNA⁺ в контрольной группе составил $78,2 \pm 10,4$ %, в группе циклофосфида - $83,7 \pm 8,7$ %, в группе ВР-СЗ - $84,0 \pm 8,6$ % и $87,6 \pm 8,2$ % в группе циклофосфамид + ВР-СЗ (Рисунок 22). Не было значимого различия между группами, за исключением тенденции к небольшому увеличению клеток PCNA⁺ после совместного введения циклофосфида с ВР-СЗ.

На 21-й день относительная средняя площадь микрососудов в опухолях составила $5,0 \pm 1,7$ % в контрольной группе, $4,6 \pm 1,5$ % в группе циклофосфида, $5,9 \pm 2,0$ % в группе ВР-СЗ и $4,0 \pm 1,5$ % в группе циклофосфамид + ВР-СЗ (Рисунок 23). Циклофосфамид, вводимый отдельно, не влияет на микроциркуляторное русло опухоли в отсроченном периоде наблюдения. Курсовое введение ВР-СЗ привело к увеличению площади микрососудов по сравнению с группой циклофосфида, но не по сравнению с контрольной группой. Интересно, что комбинированное введение циклофосфида с ВР-СЗ привело к заметному снижению плотности сосудов в опухоли.

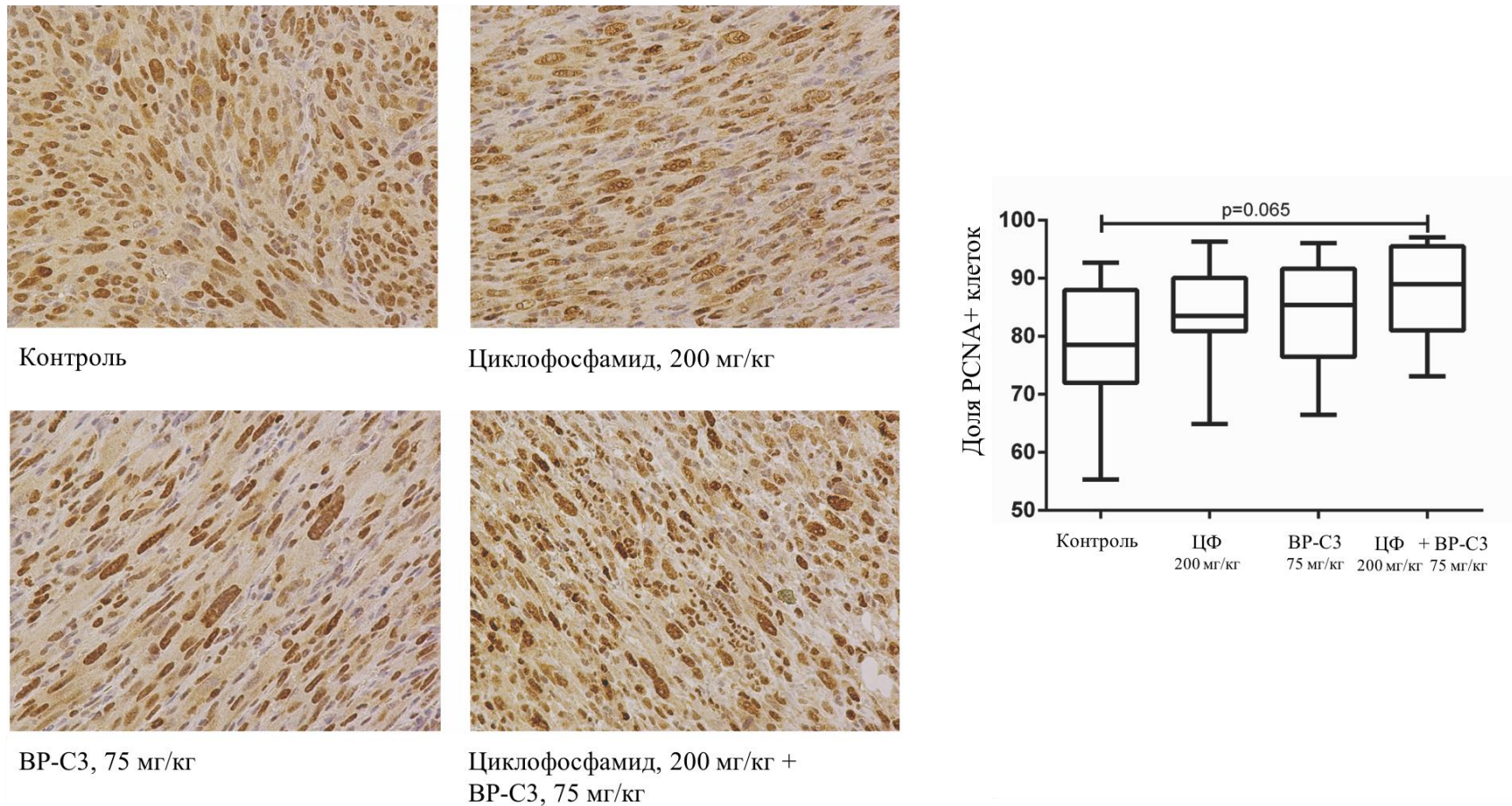
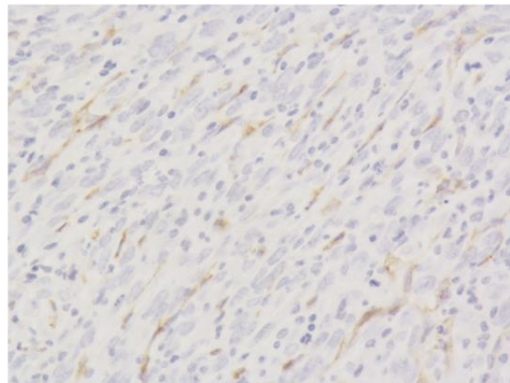
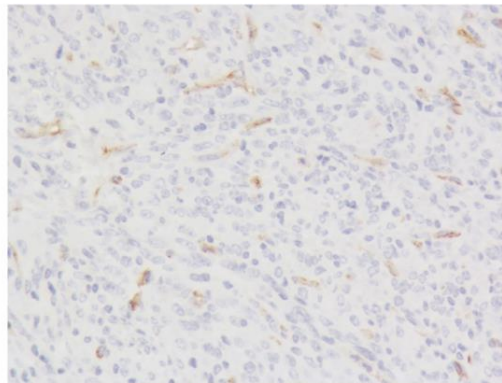


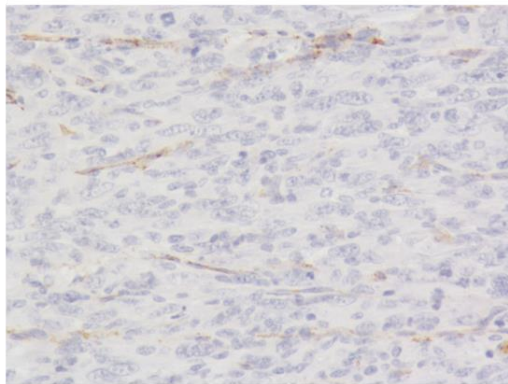
Рисунок 22 – Экспрессия PCNA (ядерного антигена пролиферирующих клеток) в опухолях. (Слева) Микрофотографии гистологических срезов сарком мягких тканей (окраска гематоксилином и диаминобензидином; объектив $\times 40$) на 21 день после введения циклофосфамида. (Справа) Доля PCNA⁺ клеток при иммуногистохимическом окрашивании. Данные представлены как $M \pm SKO$ и обработаны с помощью теста Крускала-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения



Контроль



Циклофосфамид, 200 мг/кг



VP-C3, 75 мг/кг

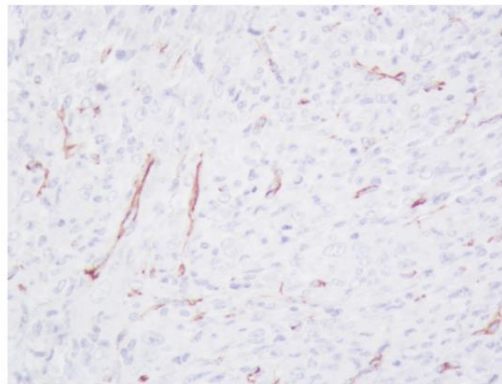
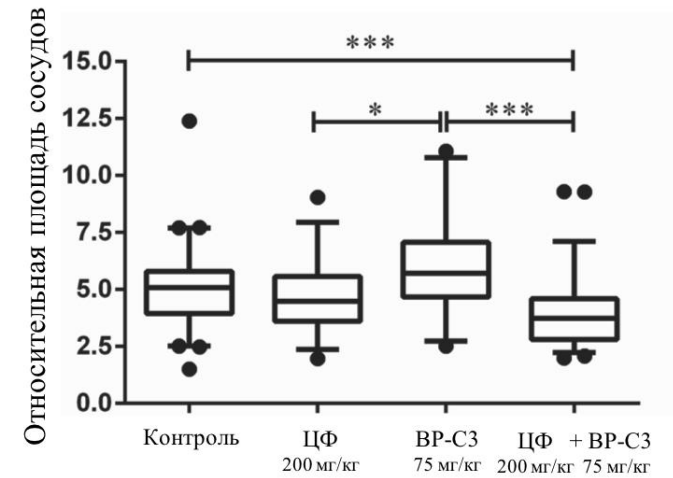
Циклофосфамид, 200 мг/кг +
VP-C3, 75 мг/кг

Рисунок 23 – Экспрессия CD31 в опухолях. (Слева) Микрофотографии гистологических срезов сарком мягких тканей (окраска гематоксилином и диаминобензидином; объектив $\times 40$) на 21 день после введения циклофосфамида. (Справа) Относительная площадь CD31-положительных микрососудов. Данные представлены как $M \pm$ СКО и обработаны с помощью теста Крускала-Уоллиса с поправкой Данна на множественные сравнения.

3.3.3. Изучение воздействия ВР-СЗ на эффективность химиотерапевтического лечения на модели спонтанных опухолей молочной железы у мышей самок линии FVB, трансгенных по HER-2/neu

Для оценки влияния ВР-СЗ на эффективность различных химиопрепаратов, применяемых для лечения опухолей молочной железы в клинической практике, проведено исследование на мышках самках линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu со сформировавшимися опухолями (аденокарциномы молочной железы), средним объемом около 0,5 см³. В ходе исследования было изучено влияние композиции ВР-СЗ на эффективность лечения схемой CAF (Циклофосфамид + Доксорубин + 5-Фторурацил), Гемцитабином и комбинацией Гемцитабин + Цисплатин.

Результаты оценки частоты стабилизаций и динамика объема опухолей приведены в таблицах (Таблица 48,

Таблица 49). Частота стабилизации заболевания, оцененная по изменению максимального линейного размера опухоли на 21 сутки по отношению к 0 суткам (день проведения химиотерапии) менее чем на 20%, составила в контрольной группе 12,5%, при терапии гемцитабином – 10% ($p=1,0$), при сочетании гемцитабина с цисплатином – 33,3% ($p=0,1618$), а при лечении по схеме CAF – 63,6% ($p=0,0006$). При сочетании ВР-СЗ с гемцитабином частота стабилизаций увеличилась на 20%, составив 30% ($p=0,2607$ по сравнению с контролем). При сочетании ВР-СЗ с комбинацией гемцитабина с цисплатином частота стабилизаций не изменилась, составила 33,3% ($p=0,4832$ по сравнению с контролем). При сочетании ВР-СЗ со схемой CAF частота стабилизаций составила 64,3% ($p=0,0026$ по сравнению с контролем). При введении только ВР-СЗ частота стабилизаций была на уровне 19% ($p=0,6886$).

Аналогичные результаты получены при анализе динамики среднего объема опухолей (

Таблица 49).

Таблица 48 – Частота стабилизаций и прогрессирования аденокарцином молочных желез у мышей-самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu при химиотерапии схемой CAF, гемцитабином и комбинацией гемцитабина с цисплатином

Группа	Число опухолей	ПЗ (%) ^a	СЗ (%) ^b
1 Контроль	24	87,5	12,5
2 Гемцитабин + Цисплатин	24	66,7	33,3
3 CAF	22	36,4	63,6 *** ##
4 Гемцитабин	20	90	10
5 ВР-СЗ + CAF	14	35,7	64,3 ** #
6 ВР-СЗ + Гемцитабин	20	70	30
7 ВР-СЗ + Гемцитабин + Цисплатин	30	76,7	33,3
8 ВР-СЗ	21	81	19

Примечания

1^a – ПЗ (прогрессирование заболевания) было определено как увеличение максимального линейного размера опухоли на 21 сутки по отношению к 0 суткам более или равным 20%.

2^b – СЗ (стабилизация заболевания) была определена при изменении максимального линейного размера к 21 суткам менее 20% от значения на 0 сутки.

3 ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, по сравнению с группой Контроль, # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ по сравнению с группой ВР-СЗ (статистическая значимость отличий по точному тесту Фишера).

Таблица 49 – Объем опухолей (см³) у мышей-самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu с аденокарциномами молочных желез при химиотерапии разными препаратами с учетом сроков эксперимента

Группа	Сутки опыта				
	0	3	7	14	21
1 Контроль	0,61±0,53	0,72±0,51	1,14±0,65	1,39±0,73	1,10±0,68
2 Гемцитабин + Цисплатин	0,56±0,50 (8)	0,55±0,60 (24)	0,67±0,74 ^{ab} (41)	0,87±0,74 ^a (37)	0,79±0,67 (28)
3 CAF	0,52±0,37 (15)	0,42±0,35 ^b (42)	0,47±0,47 ^{ab} (59)	0,52±0,46 ^{ab} (63)	0,59±0,55 ^{ab} (46)
4 Гемцитабин	0,29±0,14 (52)	0,33±0,30 ^b (54)	0,38±0,31 ^{ab} (67)	0,56±0,47 ^{ab} (60)	0,61±0,45 ^{ab} (45)
5 ВР-С3 + CAF	0,54±0,29 (11)	0,34±0,25 ^b (53)	0,44±0,42 ^{ab} (61)	0,52±0,49 ^{ab} (63)	0,51±0,34 ^{ab} (54)
6 ВР-С3 + Гемцитабин	0,47±0,38 (23)	0,40±0,48 ^b (44)	0,56±0,50 ^{ab} (51)	0,74±0,54 ^{ab} (47)	0,68±0,52 (38)
7 ВР-С3 + Гемцитабин + Цисплатин	0,54±0,43 (11)	0,48±0,37 (33)	0,56±0,45 ^{ab} (51)	0,69±0,54 ^{ab} (50)	0,86±0,58 (22)
8 ВР-С3	0,67±0,48 (-10)	0,92±0,51 (-28)	1,18±0,80 (-4)	1,27±0,82 (9)	1,13±0,57 (-3)
<p>Примечания</p> <p>1^a – p<0,05 по сравнению с группой Контроль, ^b – p<0,05 по сравнению с группой ВР-С3 (данные проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом Туки для множественных сравнений, М±СКО).</p> <p>2 В скобках приведено значение параметра ТРО, %.</p>					

При анализе массы тела мышей установлено, что на 7 сутки после введения химиопрепаратов наблюдается статистически значимое ее снижение при использовании всех трех схем химиотерапии по сравнению с показателем контрольной группы. При сочетанном введении гемцитабина или гемцитабина с цисплатином с композицией ВР-С3 масса тела мышей на 7 сутки статистически значимо не отличалась от показателя контрольной группы, хотя была в среднем ниже. При сочетании ВР-С3 и схемы САФ масса тела животных на 7 сутки была статистически значимо меньше, чем в контрольной группе. Масса селезенки была оценена в конце опыта на 21 сутки, она была меньше показателя контрольной группы только при введении мышам схемы САФ и комбинации САФ с ВР-С3 (Таблица 50).

На сроках опыта с 14 по 21 сутки масса тела животных, получавших химиотерапию, увеличивалась, но оставалась меньше значений в контрольной группе, что вероятно было обусловлено противоопухолевым эффектом, наиболее выраженным при применении схемы САФ, тогда как в контрольной группе увеличение массы тела было связано с прогрессированием опухолей (Таблица 49).

Уменьшение массы селезенки при химиотерапии схемой САФ, наблюдаемое на 21 сутки, может быть обусловлено сочетанным эффектом 5-ФУ и циклофосфида на гемопоэз, а также значительным торможением роста опухолей, соответственно, меньшей степенью выраженности лейкоцитарного ответа на рост опухоли.

Это предположение хорошо согласуется с данными о содержании лейкоцитов периферической крови (Таблица 51). К 21 суткам у животных с опухолями, пролеченных схемой САФ, отмечался уровень лейкоцитов, соответствующий нормальному уровню для мышей без опухолей. У мышей контрольной группы с опухолями, не получавшими лечения, наблюдался выраженный лейкоцитоз, который был связан в значительной степени с увеличением содержания гранулоцитов крови, в меньшей степени – лимфоцитов (Таблица 52, Таблица 53, Таблица 54).

Таблица 50 – Масса тела и масса селезенки у мышей-самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu с аденокарциномами молочных желез при химиотерапии схемой CAF, гемцитабином и комбинацией гемцитабина с цисплатином на разных сроках опыта

Группа	Сутки опыта				
	0	7	14	21	
	Масса тела, г				Масса селезенки, мг
1 Контроль	30,9±2,2	32,8±1,9	34,4±2,7	35,6±3,8	392±69
2 Гемцитабин + Цисплатин	29,3±2,4	25,9±4,7 ^{ab}	29,9±4,2	30,8±4,1 ^b	280±37
3 CAF	30,9±2,6	27,9±2,5 ^b	28,6±3,9 ^{ab}	28,9±5,3 ^{ab}	210±42 ^{ab}
4 Гемцитабин	28,4±3,6	26,6±4,7 ^{ab}	28,9±4,6 ^{ab}	31,1±4,7 ^b	350±53
5 ВР-С3 + CAF	29,5±3,4	26,5±2,9 ^{ab}	27,3±3,1 ^{ab}	28,2±5,0 ^{ab}	193±41 ^{ab}
6 ВР-С3 + Гемцитабин	30,0±4,3	28,8±4,2	31,8±5,8	34,3±6,3	384±70
7 ВР-С3 + Гемцитабин + Цисплатин	33,4±5,5	29,7±5,6	33,5±6,5	36,2±6,1	407±61
8 ВР-С3	32,3±4,9	33,4±5,0	35,0±5,0	37,1±5,2	376±61
Примечание – ^a – p<0,05 по сравнению с группой Контроль, ^b – p<0,05 по сравнению с группой ВР-С3 (данные проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, M±СКО).					

При введении мышам с опухолями схемы CAF на 7 сутки наблюдалось развитие выраженной лейкоцитопении, а при комбинации схемы CAF с ВР-С3 ее выраженность была существенно ниже, что проявлялось в большем уровне как

лейкоцитов в целом (Таблица 51), так и лимфоцитов (Таблица 52), гранулоцитов (Таблица 53) и моноцитов (Таблица 54) в отдельности.

Таблица 51 – Количество лейкоцитов периферической крови ($10^9/\text{л}$) у мышей-самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu с аденокарциномами молочных желез при химиотерапии схемой САФ, гемцитабином и комбинацией гемцитабина с цисплатином в сочетании с ВР-С3 на разных сроках опыта

Группа	Сутки опыта			
	0	7	14	21
1 Контроль	19,60±5,29	25,54±8,23	26,06±14,25	37,26±14,4 ^a
2 Гемцитабин + Цисплатин	16,40±11,98	27,88±24,90 ^a	26,05±13,46	16,35±7,94 ^b
3 САФ	17,18±8,65	5,25±2,09 ^{b,c}	32,24±14,09 ^a	13,53±3,93 ^b
4 Гемцитабин	13,64±4,83	21,22±9,59	23,68±23,36	18,70±7,76 ^b
5 ВР-С3 + САФ	23,53±13,08	10,17±9,96 ^b	32,14±24,96 ^a	12,23±4,00 ^b
6 ВР-С3 + Гемцитабин	16,04±11,40	26,52±26,31 ^a	12,74±9,87	16,92±11,39 ^b
7 ВР-С3 + Гемцитабин + Цисплатин	21,07±5,95	28,18±18,51 ^a	20,08±10,04	21,83±11,85 ^b
8 ВР-С3	14,34±6,21	18,48±8,64	15,88±7,18	20,88±11,45 ^b

Примечание – ^a – $p < 0,05$ по сравнению с 0 сутками в той же группе, ^b – $p < 0,05$ по сравнению с группой Контроль, ^c – $p < 0,05$ по сравнению с группой ВР-С3 (данные проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, $M \pm \text{СКО}$).

Введение мышам гемцитабина или гемцитабина с цисплатином не приводило к снижению общего количества лейкоцитов периферической крови.

Таблица 52 – Количество лимфоцитов периферической крови ($10^9/л$) у мышей-самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu с аденокарциномами молочных желез при химиотерапии схемой CAF, гемцитабином и комбинацией гемцитабина с цисплатином в сочетании с ВР-С3 на разных сроках опыта

Группа	Сутки опыта			
	0	7	14	21
1 Контроль	8,86±1,92	10,70±3,29	10,56±4,15	14,48±5,53
2 Гемцитабин + Цисплатин	10,13±9,81	18,40±18,55 ^{ac}	18,93±11,13 ^{ac}	7,68±6,13
3 CAF	8,70±5,29	2,03±0,69	22,97±17,16 ^{abc}	4,50±1,45 ^b
4 Гемцитабин	5,92±1,86	9,88±7,13	12,62±15,66	8,50±2,08
5 ВР-С3 + CAF	10,68±4,85	3,45±1,88	16,94±14,20 ^{ac}	4,70±1,42
6 ВР-С3 + Гемцитабин	10,54±9,54	14,60±16,49	7,56±7,46	9,98±8,15
7 ВР-С3 + Гемцитабин + Цисплатин	10,18±2,67	12,85±10,07	8,37±3,80	8,47±3,61
8 ВР-С3	6,82±2,09	8,60±4,42	5,68±1,81	6,80±4,13
<p>Примечание – ^a – $p < 0,05$ по сравнению с 0 сутками в той же группе, ^b – $p < 0,05$ по сравнению с группой Контроль, ^c – $p < 0,05$ по сравнению с группой ВР-С3 (данные проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, $M \pm СКО$).</p>				

Таблица 53 – Количество гранулоцитов периферической крови ($10^9/л$) у мышей-самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu с аденокарциномами молочных желез при химиотерапии схемой CAF, гемцитабином и комбинацией гемцитабина с цисплатином в сочетании с ВР-С3 на разных сроках опыта

Группа	Сутки опыта			
	0	7	14	21
1 Контроль	9,68±3,57	13,84±7,27	14,74±12,43 ^a	21,74±15,35 ^a
2 Гемцитабин + Цисплатин	5,40±2,28	8,57±6,19 ^a	6,47±2,63 ^b	6,47±2,63 ^b
3 CAF	7,68±5,66	2,98±1,70 ^{bc}	15,00±8,24 ^a	8,37±3,29 ^b
4 Гемцитабин	7,00±5,07	10,66±5,59	10,30±8,22	9,52±7,13 ^b
5 ВР-С3 + CAF	11,52±8,68	6,33±7,76	14,24±10,62	6,73±3,15 ^b
6 ВР-С3 + Гемцитабин	4,90±2,31	10,70±9,36	4,82±2,80 ^b	6,26±3,31 ^b
7 ВР-С3 + Гемцитабин + Цисплатин	9,78±3,83	14,17±8,34	10,80±7,58	12,55±9,25 ^b
8 ВР-С3	7,00±3,96	9,22±5,53	9,50±5,51	13,22±8,73 ^b
Примечание – ^a – $p < 0,05$ по сравнению с 0 сутками в той же группе, ^b – $p < 0,05$ по сравнению с группой Контроль, ^c – $p < 0,05$ по сравнению с группой ВР-С3 (данные проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, $M \pm СКО$).				

Таблица 54 – Количество моноцитов периферической крови ($10^9/л$) у мышей-самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu с аденокарциномами молочных желез при химиотерапии схемой CAF, гемцитабином и комбинацией гемцитабина с цисплатином в сочетании с ВР-С3 на разных сроках опыта

Группа	Сутки опыта			
	0	7	14	21
1 Контроль	1,06±0,21	1,00±0,23	0,76±0,32	1,04±0,23
2 Гемцитабин + Цисплатин	0,87±0,37	0,92±0,76	0,65±0,22	0,65±0,29
3 CAF	0,80±0,31	0,23±0,15 ^b	1,10±0,68 ^a	0,67±0,35
4 Гемцитабин	0,72±0,29	0,68±0,29	0,76±0,36	0,68±0,29
5 ВР-С3 + CAF	1,33±0,28 ^{ab}	0,38±0,37 ^b	0,96±0,35	0,80±0,14
6 ВР-С3 + Гемцитабин	0,60±0,41	1,22±0,53 ^{ac}	0,36±0,23	0,68±0,15
7 ВР-С3 + Гемцитабин + Цисплатин	1,10±0,46	1,17±0,54 ^{ac}	0,92±0,41	0,82±0,32
8 ВР-С3	0,52±0,29 ^b	0,66±0,36	0,70±0,27	0,86±0,24
Примечание – ^a – $p < 0,05$ по сравнению с 0 сутками в той же группе, ^b – $p < 0,05$ по сравнению с группой Контроль, ^c – $p < 0,05$ по сравнению с группой ВР-С3 (данные проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, $M \pm СКО$).				

При анализе уровня эритроцитов у мышей с опухолью выявлено, что рост опухолей молочной железы приводит к развитию анемии (Таблица 55). Наблюдалась выраженная тенденция к снижению содержания эритроцитов в крови контрольных мышей на всех сроках наблюдения (7, 14, 21 сутки) по сравнению с 0 сутками опыта.

Таблица 55 – Количество эритроцитов периферической крови ($10^{12}/л$) у мышей-самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu с аденокарциномами молочных желез при химиотерапии схемой САФ, гемцитабином и комбинацией гемцитабина с цисплатином в сочетании с ВР-С3 на разных сроках опыта

Группа	Сутки опыта			
	0	7	14	21
1 Контроль	6,39±1,15	5,79±0,84	5,03±0,86	4,90±1,07
2 Гемцитабин + Цисплатин	7,12±2,10	5,83±2,40	5,07±1,26 ^a	6,18±1,80
3 САФ	7,21±1,16	4,37±1,27 ^{a c}	6,18±0,81	7,79±2,05 ^b
4 Гемцитабин	7,89±1,10	6,28±1,47 ^a	6,63±1,98	7,00±1,84 ^b
5 ВР-С3 + САФ	6,63±1,13	4,47±1,56 ^{a c}	6,54±0,85	7,28±2,15 ^b
6 ВР-С3 + Гемцитабин	7,75±2,31	6,02±1,98	6,61±1,32	6,29±1,97
7 ВР-С3 + Гемцитабин + Цисплатин	6,40±1,38	5,57±1,73	6,06±1,21	6,34±1,51
8 ВР-С3	7,53±1,72	7,09±1,64	6,12±1,05	5,99±1,43
Примечание – ^a – $p < 0,05$ по сравнению с 0 сутками в той же группе, ^b – $p < 0,05$ по сравнению с группой Контроль, ^c – $p < 0,05$ по сравнению с группой ВР-С3 (данные проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом наименее значимой разницы Фишера, $M \pm СКО$).				

Аналогичная тенденция наблюдалась и в группе мышей, получавших только композицию ВР-С3, но в меньшей степени. Во всех группах животных, получавших химиотерапию, к 21 суткам показатель уровня эритроцитов крови был в пределах нормальных значений. Вероятно, такая динамика эритроцитов крови

связана с прогрессированием опухолей в контрольной группе животных и торможением их роста при проведении химиотерапии.

Следует отметить, что при проведении химиотерапии схемой САФ у мышей наблюдалось статистически значимое снижение уровня эритроцитов на 7 сутки, развитие анемии вероятно связано с миелосупрессивным эффектом 5-ФУ и циклофосфида. Сочетанное применение схемы САФ и композиции ВР-С3 не оказало влияния на динамику содержания эритроцитов периферической крови у мышей-самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu с аденокарциномами молочных желез.

3.4. Оценка безопасности длительного применения композиции ВР-С3

Исследование безопасности длительного применения композиции ВР-С3 проведено по протоколу, который был разработан в научной лаборатории канцерогенеза и старения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России [2, 66, 70].

Поскольку в долгосрочных экспериментах на грызунах на результаты могут оказывать влияние многие факторы, которые включают состояние здоровья и условия содержания, кормление, генетическую характеристику, параметры исследования могут контролироваться и изменяться в зависимости от задач исследования. Для получения максимально полной информации, насколько это возможно, в таких экспериментах важное значение имеет выбор оцениваемых параметров, а также выбор линии животных, пола, размер выборки (число животных в контрольной и подопытных группах).

Испытания на канцерогенность регулируются специальными требованиями [37]. Обычно используется схема опыта на 2 видах животных (крысы, мыши) обоего пола (самцы и самки). Для оценки дозовой зависимости исследуются 3 уровня доз вещества и 2 пути его введения (например, с кормом или питьевой

водой, и парентеральное введение – инъекции), при этом один из путей введения должен соответствовать пути применения испытываемого соединения в клинической практике. Таким образом, учитывая, что в группах должно быть не менее 50 животных одного пола, для испытания одного вещества при одном пути введения требуется не менее 800 животных (400 мышей и 400 крыс). В нашей лаборатории испытания на канцерогенность обычно сочетают с выявлением геропротекторной активности препаратов, что в конечном счете существенно экономит время и уменьшает трудоемкость и стоимость исследований. Был разработан и в течение многих лет успешно используется стандартный протокол испытаний потенциальных геропротекторов, который включен в изданное в 2007 г. в США руководство «Биология старения: Методы и протоколы» [69]. В соответствие с этим протоколом, линии мышей должны быть хорошо охарактеризованы генетически, должны быть известны их продолжительность жизни и спонтанная патология, сходная с таковой у человека, без доминирования какого-либо одного заболевания. Наиболее важным аспектом является длительный опыт работы с используемыми линиями в лаборатории, где такое исследование будет выполняться. Желательно использовать оба пола мышей, однако при ограниченных возможностях предпочтение отдается самкам, поскольку самцы при групповом содержании агрессивны и убивают более слабых особей [2].

Учитывая вышеуказанные обстоятельства, проводилось исследование композиции ВР-СЗ для оценки безопасности как кандидата для оказания помощи пациентам, получающим курсы химиотерапии, а значит с высокой вероятностью ВР-СЗ может применяться длительно, поэтому был изучен эффект длительного применения этого соединения на продолжительность жизни и спонтанный канцерогенез у лабораторных мышей-самок линии SHR. Животные получали раствор ВР-СЗ в питьевой воде на протяжении всей жизни.

Ниже представлены данные изменения у животных массы тела (Рисунок 24А), потребления корма (Рисунок 24Б) и жидкости (Рисунок 24В), температуры тела (Рисунок 24Г) и эстральной функции (Рисунок 25А, Б).

Масса тела животных контрольной и получавшей ВР-СЗ групп увеличивалась с возрастом, и к 11 месяцу в контрольной группе превосходила исходные показатели для 3-месячных животных на 25,3% и на 28,7% в группе животных, получавших ВР-СЗ. Затем наблюдалась стабилизация массы тела и постепенное ее снижение к возрасту 2 лет. Статистически значимых различий в массе тела контрольных и опытных животных на протяжении опыта выявлено не было (Рисунок 24А) [67].

Колебания в потреблении корма и жидкости в разном возрасте наблюдались в обеих группах и в определенной мере коррелировали (Рисунок 24Б, В). Композиция ВР-СЗ не оказывала существенного влияния на потребление корма и жидкости животными, которые колебались на уровне 3-5 г/мышь/сутки и 3-6 мл/мышь/сутки, соответственно. Исключением явились данные, полученные в возрасте 14-16 месяцев, когда потребление корма и жидкости в группе, получавшей ВР-СЗ превышало показатель в контрольной группе ($p < 0,05$) [67].

Наблюдалось постепенное снижение температуры тела у мышей обеих групп в возрасте от 3 до 17 месяцев, после чего последовал резкий подъем. У мышей, получавших ВР-СЗ, было зарегистрировано статистически значимо меньшая температура тела в возрасте 6 месяцев, 9,5 месяцев, 16,5 месяцев и 19,5 месяцев (Рисунок 24Г), по сравнению с контрольной группой. Самое низкое значение температуры тела в обеих группах было зарегистрировано в возрасте 16,5 месяцев: $36,4 \pm 0,06$ °С в контрольной группе и $36,0 \pm 0,08$ °С в группе ВР-СЗ ($p < 0,01$) [67].

Начиная с 13,5 месяцев у контрольных мышей наблюдались возрастные нарушения эстральной функции (Рисунок 25А, Б), увеличивалась частота мышей с нерегулярными циклами. Длительность эстрального цикла была увеличена у контрольных мышей после возраста 13,5 месяцев, а в возрасте 19,5 месяцев была на 1,3 дня дольше, чем у мышей, получавших ВР-СЗ ($7,7 \pm 0,5$ дня против $6,4 \pm 0,4$ дня, соответственно, $p < 0,05$). Такие изменения не наблюдались в группе ВР-СЗ до возраста 19,5 месяцев. Частота мышей с регулярными циклами в подопытной группе по сравнению с контрольной была больше в 5 раз в 13,5 месяцев ($p < 0,05$) и в 3 раза – в 16,5 месяцев ($p < 0,05$) [67].

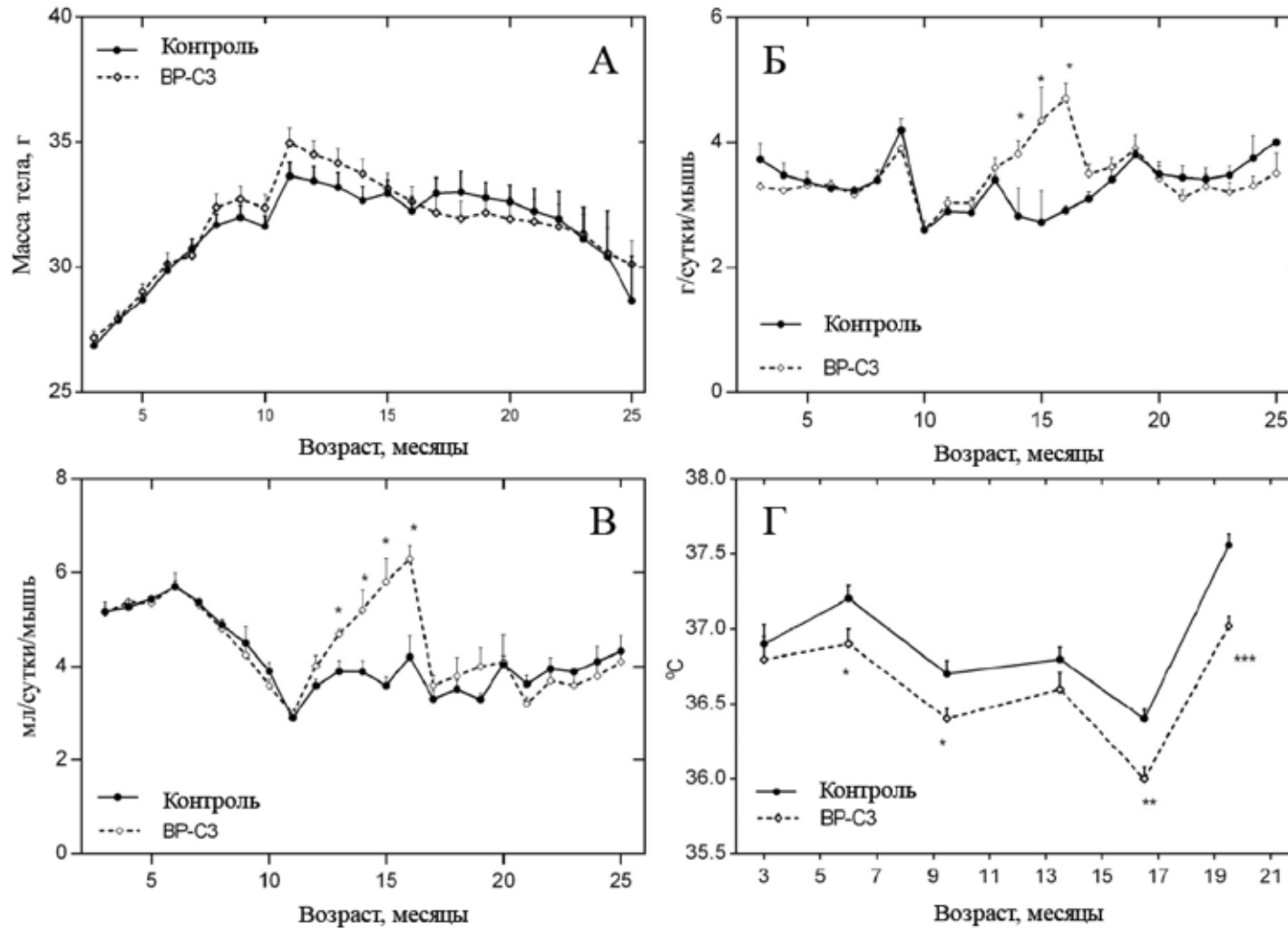


Рисунок 24 – Масса тела с (А), потребление корма (Б), потребление жидкости (В) и температура тела (Г) у мышей линии SHR не получавших и получавших VP-C3 в разном возрасте. * – различия с контролем соответствующего возраста статистически значимы, $p < 0,05$

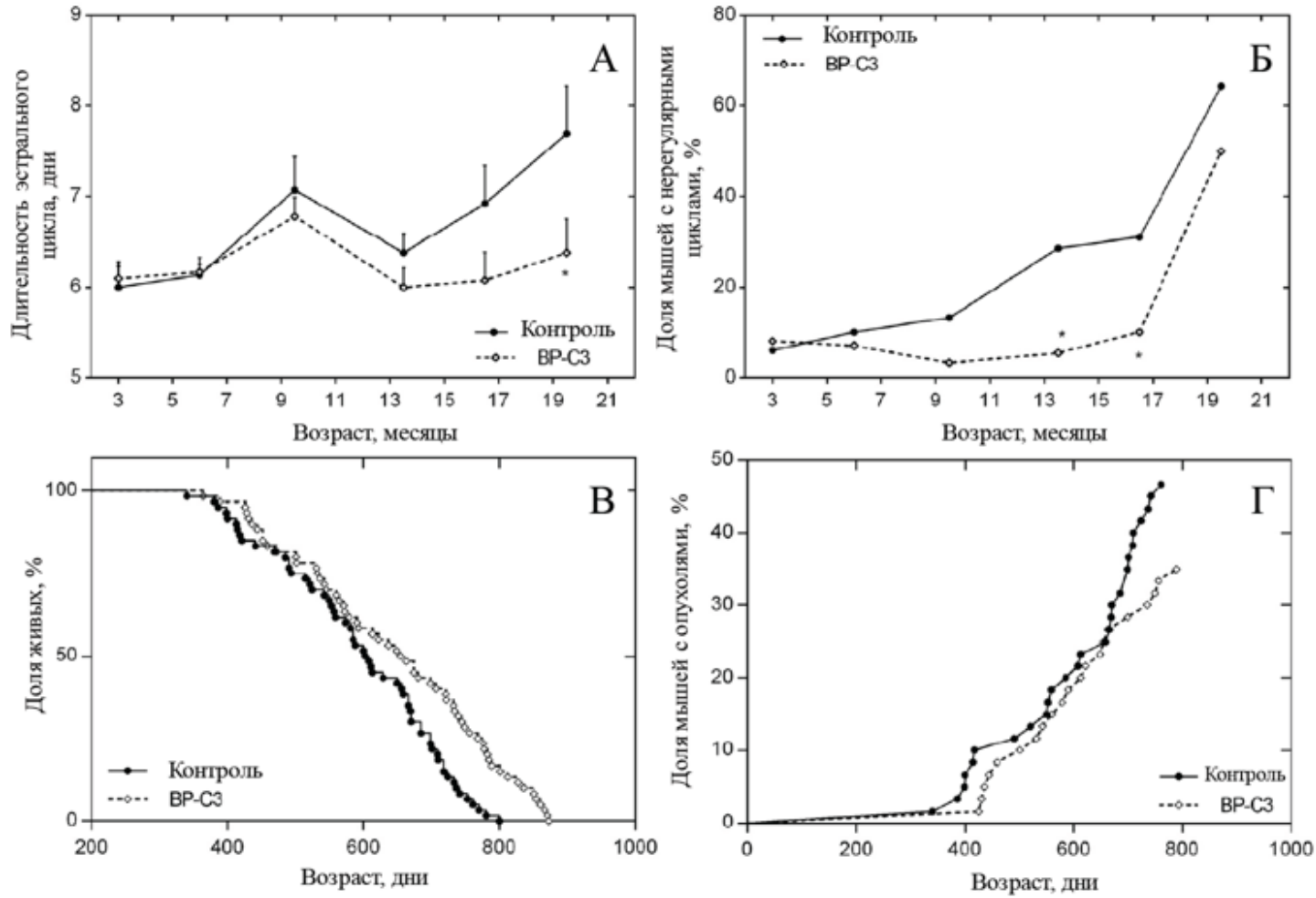


Рисунок 25 – Длительность эстрального цикла (А), доля мышей с нерегулярными эстральными циклами (Б), выживаемость (В) и развитие опухолей (Г) у мышей линии SHR не получавших и получавших VP-C3 в разном возрасте.

* – различия с контролем соответствующего возраста статистически значимы, $p < 0,05$

Динамика выживаемости контрольных и получавших ВР-С3 животных представлена на кривых Каплана-Мейера (Рисунок 25А). Данные свидетельствуют о том, что в начальные сроки опыта выживаемость в подопытной и контрольной группах была примерно равной. Однако после 600 дня жизни в контрольной группе выживаемость значительно снижалась, тогда как количество подопытных мышей уменьшалось медленнее. Это отразилось на показателях продолжительности жизни животных. В соответствие с логранговым критерием в тесте Мантела-Кокса, наблюдались статистически значимые различия в выживаемости животных контрольной и получавшей ВР-С3 групп ($p=0,0015$), причем наиболее существенным был вклад последнего квартиля (25% последних выживших животных, $p<0,0001$). Различий в выживаемости первого квартиля не наблюдалось (25% первых павших животных, $p=0,088$).

Как следует из полученных данных (Таблица 56), максимальная продолжительность жизни под влиянием композиции увеличивалась на 73 дня (на 9,1%); средняя продолжительность жизни – на 50 дней (8,4%, $p<0,05$); средняя продолжительность жизни последних 10% выживших мышей – на 95 дней (12,4%, $p<0,01$) [67].

Таблица 56 – Показатели продолжительности жизни мышей-самок линии SHR, получавших и не получавших ВР-С3

Параметры	Контроль	ВР-С3	Δ , %
Число мышей	60	60	–
СПЖ, дни ($M\pm m$)	$596,0 \pm 15,5$	$646,0 \pm 18,7$ **	+8,4%
Максимальная продолжительность жизни, дни	800	873	+9,1%
СПЖ 10% последних выживших, дни ($M\pm m$)	$768,0 \pm 8,5$	$863,0 \pm 3,7$ **	+12,4%
Число мышей без опухолей (доля)	31 (52%)	39 (65%)	+13%
СПЖ мышей без опухолей, дни ($M\pm m$)	$606,0 \pm 21,7$	$676,0 \pm 24,3$ *	+11,6%
Примечание – * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$ по сравнению с контролем.			

При проведении оценки безопасности в длительных опытах на грызунах особый интерес представляют данные о развитии у животных опухолевой и неопухолевой патологии. Результаты оценки частоты развития заболеваний у мышей-самок SHR приведены ниже (Таблица 57).

При вскрытии выявлено, что причинами гибели животных в обеих группах были опухолевые (48% в контрольной группе и 36% в подопытной) и неопухолевые заболевания (пневмония, гепатит, нефропатия, гнойный аднексит, энтерит и другие), которые у части животных сочетались. Средняя продолжительность жизни мышей без опухолей была выше в группе, получавшей ВР-СЗ ($676,0 \pm 24,3$ суток), по сравнению с контролем ($606,0 \pm 21,7$, $p < 0,05$). Частота развития различной неопухолевой патологии статистически значимо не отличалась между опытной и контрольной группами [67].

Различия между средней продолжительностью жизни животных с опухолями в контрольной группе ($595,0 \pm 24,2$ суток) и группе, получавшей ВР-СЗ ($592,0 \pm 25,3$ суток), не достигают уровня статистической значимости ($p = 0,17$).

Возраст до обнаружения первой опухоли в контрольной группе составил 291 день, в опытной – 338 дней (на 1,2 месяца позже). Количество мышей с опухолями в контрольной группе на 12% превышало таковое в группе, получавшей ВР-СЗ ($p = 0,198$). Общее количество опухолей у животных группы, получавшей ВР-СЗ, было меньше, чем в контроле (21 и 34 случая, соответственно). Обнаруженные отличия показателей спонтанного канцерогенеза под влиянием ВР-СЗ, могут свидетельствовать об антиканцерогенном эффекте этой композиции [67].

Основным типом опухоли у животных были новообразования молочных желез, которые в большинстве случаев были единичными. При гистологическом исследовании все выявленные новообразования молочных желез представляли собой аденокарциномы различного строения с выраженной инвазией окружающих тканей. Большинство опухолей по своей гистологической структуре соответствовали аденокарциноме типа А.

Таблица 57 – Частота возникновения спонтанных опухолей и неопухолевого патологического процесса у самок мышей SHR, получавших и не получавших ВР-СЗ

Параметр	Контроль	ВР-СЗ
Число мышей	60	60
Общее количество мышей с опухолями	29 (48%)	21 (36%)
Число мышей со злокачественными опухолями	27 (45%)	20 (34%)
Общее число опухолей	34	21
Число злокачественных опухолей	32	20
Среднее количество опухолей среди мышей с опухолями	1,17 ± 0,05	1,00 ± 0,00*
Возраст обнаружения первой опухоли, дни	291	338
СПЖ мышей с опухолями, дни (M±m)	595,0 ± 24,2	592,0 ± 25,3
<i>Локализация и тип опухолей (количество случаев, %)</i>		
Аденокарцинома молочной железы	22 (33%)	15 (25%)
Злокачественная лимфома	6 (10%)	4 (7%)
Аденома легкого	1 (2%)	1 (2%)
Аденокарцинома легкого	1 (2%)	1 (2%)
Подкожная фибросаркома	2 (3%)	-
Кавернозная гемангиома печени	1 (2%)	-
Гранулезоклеточная опухоль яичника	1 (2%)	-
<i>Неопухолевая патология (количество случаев, %)</i>		
Пневмония	25 (42%)	30 (50%)
Гепатит	5 (8%)	3 (5%)
Нефропатия	5 (8%)	8 (13%)
Энтерит	3 (5%)	5 (8%)
Аднексит	3 (5%)	2 (3%)
Перитонит	2 (3%)	0
Кровотечение	0	1 (2%)
Примечание – * – p<0,05 по сравнению с контролем.		

В опытной группе отсутствовали случаи множественного рака, частота его встречаемости в контрольной группе составила 8% (p=0,057). У двух мышей контрольной группы возникло по 2 новообразования молочной железы и у трех

животных аденокарциномы молочной железы сочеталась с лимфопролиферативными заболеваниями, которые были вторым по частоте типом опухоли в обеих группах. Среди последних преобладали злокачественные диссеминированные лимфомы с поражением всех периферических лимфатических узлов, печени, селезенки и парааортальных лимфатических узлов. В двух случаях у мышей контрольной группы выявлены злокачественные лимфомы с поражением тимуса, опухоли достигали 1,5 см, сдавливая прилежащие участки долей легкого и предсердия.

У двух мышей контрольной группы и двух из опытной группы были обнаружены новообразования легкого. В обеих группах они имели вид расположенных под плеврой серо-розовых узелков диаметром 0,1-0,2 см или единичных более крупных узлов, достигавших в диаметре 0,5 см. При гистологическом исследовании мелкие опухолевые узелки представляли собой аденомы трабекулярного и тубулярного строения, состоявшие из равномерных овальных клеток, предположительно альвеологенного происхождения, окруженных капсулой. Крупные опухолевые узлы являлись аденокарциномами папиллярного строения и были выявлены у одного животного контрольной и одного опытной группы. В единичных случаях в контрольной группе встречались другие типы опухолей (Таблица 57) [67].

4. Заключение и обсуждение

4.1. Потенциальные терапевтические эффекты при применении композиции ВР-СЗ в качестве средства сопровождения при химиотерапии

Проведена оценка влияния композиции ВР-СЗ на побочные эффекты, связанные с повреждением нормальных тканей при применении противоопухолевых цитостатиков из групп антиметаболитов (5-ФУ) и алкилирующих агентов (циклофосфамид).

Повреждение клеток при введении 5-ФУ, обусловлены его внутриклеточным превращением в 5-ФУ-дезоксинуклеотид, который включается в РНК, препятствует процессингу РНК, а также ингибирует фермент тимидилатсинтазу, тем самым влияя на синтез и репарацию ДНК [292]. 5-ФУ эффективен у пациентов со злокачественными новообразованиями органов пищеварительной системы (рак пищевода, желудка, кишечника, толстой кишки, поджелудочной железы и печени) и молочной железы [246]. Токсичность 5-ФУ связана, прежде всего, с его влиянием на быстро обновляющиеся ткани. Основными факторами, лимитирующими дозу 5-ФУ, являются миелосупрессия и повреждение слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта [272]. Генерация активных форм кислорода (АФК) является ведущим механизмом синергетического эффекта схем полихимиотерапии, включающих 5-ФУ, вызывающих нарушение действия антиоксидантных ферментов [225], а также является одним из ведущих факторов развития ассоциированного с 5-ФУ мукозита [209].

Циклофосфамид – широко применяемый алкилирующий агент для лечения гематологических [133, 281] и солидных опухолей [117, 296], основная токсичность которого связана с подавлением кроветворной системы и, в меньшей степени, с влиянием на негемопоезические органы [97].

В проведенном нами исследовании, установлена оптимальная дозировка композиции ВР-С3 (80 мг/кг перорально), оказывающая при введении мышам защитное действие в отношении токсических эффектов 5-ФУ и циклофосфида.

Одним из механизмов действия изучаемой полифенольной композиции может быть антиоксидантная активность. В клетке полифенолы связываются с многочисленными мишенями, нейтрализуют свободные радикалы и влияют на многочисленные сигнальные пути, включая эпигенетическую регуляцию экспрессии генов и функцию митохондрий [84]. Индукция окислительного стресса является одним из механизмов действия различных противоопухолевых веществ; следовательно, эффективность химиотерапии может модулироваться веществами с антиоксидантными свойствами. К наиболее распространенным экзогенным антиоксидантам следует отнести полифенольные соединения, которые защищают организм от сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, рака и инфекционных заболеваний [244]. Такие антиоксиданты могут защищать нормальные ткани, не влияя на эффективность противоопухолевых химиотерапевтических препаратов [202, 205]. Как это ни парадоксально, полифенолы оказывают антиоксидантное действие на здоровые клетки, в то время как в опухолевых клетках они увеличивают продукцию свободных радикалов, вызывая старение (senescence) клеток, остановку клеточного цикла и апоптоз [234]. В присутствии ионов меди, которых в опухолевых клетках больше, чем в нормальных клетках [164], некоторые полифенолы (лютеолин, апигенин, эпигаллокатехин-3-галлат и ресвератрол) действуют в качестве прооксидантов. Противоопухолевый эффект этих полифенолов значительно уменьшается в присутствии хелаторов меди [187].

При пероральном способе введения, биодоступность изучаемого полифенольного лиганда составляет от 5 до 10% при достаточно интенсивном выведении (см. раздел 3.1.3), т.е, концентрация полифенолов в крови экспериментальных животных при введении в дозе 80 мг/кг не может превышать 4-8 мг/кг. Прямое антиоксидантное действие полифенольного лиганда может быть сравнимо с действием аскорбиновой кислоты в дозе 0,5-1 мг/кг или дигидрокверцетина в дозе 0,8-1,5 мг/кг у мышей. Поскольку дозы данных

антиоксидантов, необходимые для получения прямого антиоксидантного действия у лабораторных грызунов, составляют не менее 100 мг/кг [27, 42], а ВР-СЗ существенно им уступает в антиоксидантной емкости, можно предположить, что механизм антиоксидантного действия связан не столько с прямым «перехватом» активных форм кислорода и/или перекисей, сколько опосредованным воздействием. В частности, нами показано, что ВР-СЗ оказывал корректирующее влияние на нарушения антиоксидантной системы экспериментальных животных, вызванные пятикратным введением 5-ФУ на модели острого энтерита у мышей, которое проявлялось в нормализации повышенного при введении 5-ФУ уровня ТБК-реактивных продуктов и сниженной пероксидразрушающей активности. Таким образом, композицию ВР-СЗ можно охарактеризовать как антиоксидант непрямого действия. Известно, что наряду с прямым антиоксидантным эффектом, флавоноиды растений и фруктов способны повышать активность детоксифицирующих ферментов [215].

В последние годы полифенольные соединения активно исследуются в качестве возможных агентов для снижения токсичности противоопухолевых средств. Примечательно, что различные полифенольные средства являются средствами так называемой «народной медицины» и представляют собой многокомпонентные смеси, различные компоненты которых могут усиливать действие друг друга. Например, прополис – смесь сотен полифенолов, уменьшает токсичность циклофосфида посредством множества механизмов, которые включают противовирусный, антиоксидантный, противовоспалительный, антипролиферативный, противоопухолевый и иммуномодулирующий эффекты [55]. В опытах на мышах, подвергшихся воздействию γ -излучения, показано, что смесь полифенолов зеленого чая обладала большей протекторной активностью, чем отдельные компоненты [206]. Ограничениями изучения таких комплексных соединений является отсутствие связи определенного эффекта с конкретной молекулой в комплексном соединении. Небольшие молекулы, такие как ресвератрол, лишены этих недостатков, и было показано, что ресвератрол, природное полифенольное соединение, способен восстанавливать повреждения

органов, вызванные циклофосфамидом, проявляющиеся повышенным соотношением массы органов к телу для сердца, почек и печени и сопровождаемые изменениями уровня креатинкиназы сыворотки, азота мочевины крови, креатинина, аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы [138]. Таким образом, авторы рассматривают ресвератрол в качестве адъювантного средства при лечении циклофосфамидом, что защищает органы от повреждения посредством антиоксидантных и противовоспалительных механизмов.

Нами проведена оценка влияния ВР-СЗ на динамику гематологических показателей периферической крови у животных, подвергшихся воздействию высоких доз 5-ФУ и циклофосфамида. Токсичность циклофосфамида проявлялась существенным падением содержания лейкоцитов (на 92% к 4 дню, Рисунок 15). Токсическое влияние в случае использования 5-фторурацила выражалось в снижении содержания лейкоцитов (на 50% к 4 дню), развивалась анемия (падение уровня содержания эритроцитов 35% к 11 суткам, Рисунок 16).

Влияние композиции ВР-СЗ проявлялось в более быстром восстановлении показателей крови при её комбинации с цитостатическими препаратами, тогда как монотерапия ВР-СЗ не оказывала какого-либо влияния на показатели периферической крови мышей.

При изучении действия композиции ВР-СЗ на кроветворную систему экспериментальных животных, получавших цитостатики, была оценена клеточность костного мозга мышей. Степень токсического поражения костного мозга на 4 день опыта в целом аналогична картине, наблюдавшейся в периферической крови. Применение ВР-СЗ сопровождалось увеличением клеточности костного мозга при сочетании с циклофосфамидом и 5-ФУ, и приводило к более быстрому восстановлению этого показателя уже к 11 суткам после введения цитостатиков (Таблица 30). Масса селезенки мышей, как показатель лимфопоэза, резко уменьшалась при введении как циклофосфамида, так и 5-ФУ, а комбинация композиции с 5-ФУ оказывала стимулирующий эффект. Исследуемая композиция ВР-СЗ при комбинации с циклофосфамидом и 5-фторурацилом способствовала сохранению исходной массы селезенки

экспериментальных животных на 4 день опыта (Рисунок 17, Таблица 31) и вызывал ее увеличение по сравнению с контролем на 11 день опыта (Таблица 31).

Актуальной задачей при выборе препаратов для сопроводительного лечения является определение оптимального режима их применения при сочетании с химиотерапией. Нами исследована эффективность введения композиции ВР-СЗ по лечебной и лечебно-профилактической схеме на модели индуцированной 5-ФУ миелосупрессии у мышей линии SHR [262]. Среди мышей, получавших 5-ФУ, наблюдалась гибель части животных, свидетельствующая о том, что 5-ФУ оказал токсическое действие (Таблица 32). При введении ВР-СЗ в лечебно-профилактическом режиме гибель животных была отсроченной, а при введении в лечебном режиме, т.е. через 24 часа после 5-ФУ, она была значительно меньшей. У всех погибших животных основным макроскопически регистрируемым изменением был энтерит. При гистологическом исследовании образцов тощей кишки на 4-й день после введения 5-ФУ наблюдались гибель крипт, укорочение или потеря ворсин и хронический воспалительный ответ в слизистой оболочке кишечника. Введение ВР-СЗ способствовало сохранению жизнеспособности кишечных крипт как при лечебно-профилактической, так и при терапевтической схемах. Монотерапия ВР-СЗ не влияла на число жизнеспособных кишечных крипт. Таким образом установлено, что ВР-СЗ обладает выраженным защитным эффектом в отношении эпителия тонкой кишки, повреждаемой 5-ФУ.

Токсическое действие 5-ФУ проявлялось также снижением массы тела животных. В среднем показатель массы тела незначительно снижался на 7% (на 4-й день), а к 11-му дню статистически значимых различий между экспериментальными группами не обнаружено. Для оценки органоспецифического токсического действия 5-ФУ были изучены органо-весовые коэффициенты селезенки, тимуса, сердца, печени и почек (Таблица 34). Основными органами-мишенями токсического эффекта 5-ФУ у мышей оказались селезенка и тимус. Этот эффект проявлялся значительным снижением коэффициентов массы этих органов к массе тела на 4-й день после введения 5-ФУ по сравнению с их значениями в контрольной группе ($p < 0,05$). При применении ВР-СЗ как в терапевтическом, так и

в лечебно-профилактическом режиме уменьшалось токсическое действие 5-ФУ в отношении органов лимфопоэза. К 20-му дню наблюдалось значительное увеличение веса селезенки во всех группах, которые получали 5-ФУ, по сравнению с таковым в контрольной группе ($p < 0,05$), тогда как при введении ВР-СЗ в терапевтическом режиме снижения массы селезенки не наблюдалось. При одновременном введении ВР-СЗ с 5-ФУ в зависимости от режима применения ВР-СЗ наблюдались различия в миелотоксическом эффекте 5-ФУ во время фазы восстановления гемопоэза. При анализе гемограмм у животных, получавших 5-ФУ, на 4-й и 7-й дни была выявлена выраженная лейкопения, которая сменялась лейкоцитозом к 14-17-му дню опыта. Подобная картина не наблюдалась при терапевтическом применении ВР-СЗ, нормализация показателей белой крови происходила без превышения верхней границы нормы. Изменения в популяциях лимфоцитов, гранулоцитов и моноцитов были аналогичными. В ответ на введение 5-ФУ у мышей развивалась также легкая анемия между 7-м и 11-м днями, при комбинированном его введении с ВР-СЗ в лечебно-профилактическом режиме развитие анемии было отсрочено, тогда как ВР-СЗ в лечебном режиме предотвращал развитие анемии у мышей. Таким образом, эффект сочетанного применения ВР-СЗ с 5-ФУ на параметры кроветворных органов и периферической крови зависит от режима их введения.

Результаты наших исследований полифенолов на основе гидролизного лигнина в определенной мере согласуются с описанными в литературе эффектами других полифенолов. В частности, кверцетин защищает нормальные клетки почечных канальцев от повреждающего действия лекарств, уменьшает тошноту и рвоту, ассоциированную с лекарственными средствами [289]. Традиционное растительное средство японской медицины полифенольной природы Saireito (TJ-114) защищает кишечный эпителий при применении 5-ФУ [186].

Учитывая возможное модифицирующее влияние полифенольных соединений на эффективность химиотерапевтических средств, терапевтический режим их применения представляется более адекватным, поскольку не препятствует реализации повреждающего действия цитостатических препаратов

на опухолевые клетки и, в дальнейшем, уменьшает повреждение нормальных тканей. Оценка влияния полифенольной композиции ВР-СЗ на потенциальную возможность защищать или восстанавливать клеточный пул самой опухоли, была нами проведена в отдельной серии экспериментов.

Было изучено влияние ВР-СЗ на эффективность лечения циклофосфамидом сарком мягких тканей, индуцированных бенз(а)пиреном у мышей [263]. Средний объем опухоли у мышей-самцов контрольной группы в течение опыта увеличивался. Введение циклофосфамида привело к статистически значимому торможению роста опухоли на 69-85% к 7-21-м суткам опыта. Комбинированное введение циклофосфамида и ВР-СЗ привело к торможению роста опухоли на 64-84% в эти же сроки (Таблица 42). Циклофосфамид, при введении мышам-самкам, статистически значимо тормозил рост опухоли на 58-74% на 12-21-е сутки, а при сочетании ВР-СЗ и циклофосфамида торможение роста опухоли составило 35-68% на 12-21-е сутки опыта (Таблица 44). При оценке пролиферативной активности опухолей на 21-й день после введения циклофосфамида, было выявлено, что она является высокой, доля клеток PCNA⁺ в контрольной группе составила 78%. Не было выявлено значимого различия между группами, за исключением тенденции к небольшому увеличению доли клеток PCNA⁺ после совместного введения циклофосфамида с ВР-СЗ. На 21-й день относительная средняя площадь микрососудов в опухолях составила 5% в контрольной группе и 4% в группе, подвергавшейся комбинированному воздействию циклофосфамида и ВР-СЗ (Рисунок 21). Другими словами, курсовое введение ВР-СЗ после воздействия циклофосфамида сопровождалось заметным снижением плотности сосудов в опухоли. Таким образом, на модели сарком мягких тканей, индуцированных бенз(а)пиреном у мышей установлено, что введение ВР-СЗ вместе с циклофосфамидом не уменьшает противоопухолевую активность цитостатика.

Влияние ВР-СЗ на эффективность противоопухолевого лечения была оценена также на модели спонтанных аденокарцином молочных желез у трансгенных HER-2/neu мышей самок. В ходе исследования было изучено влияние композиции ВР-СЗ на эффективность лечения схемой CAF (Циклофосфамид +

Доксорубицин + 5-Фторурацил), Гемцитабином и комбинацией Гемцитабин + Цисплатин (Таблица 48, Таблица 49). Эффективность лечения, оцениваемая по критерию стабилизации заболевания, составила в контрольной группе 12,5%, при терапии гемцитабином – 10%, при сочетании гемцитабина с цисплатином – 33,3%, а при лечении по схеме CAF – 63,6% ($p=0,0006$). При сочетании ВР-С3 с гемцитабином частота стабилизаций увеличилась на 20%, составив 30%, при сочетании ВР-С3 с гемцитабином и цисплатином частота стабилизаций не изменилась и составила 33,3%, а при сочетании ВР-С3 со схемой CAF частота стабилизаций составила 64,3% ($p=0,0026$ по сравнению с контролем). При введении только ВР-С3 частота стабилизаций была на уровне 19%, что на 6,5% больше, чем в контроле.

Следует отметить, что в литературе имеются указания о собственной противоопухолевой активности различных соединений из группы полифенолов. Они замедляют рост различных линий опухолевых клеток *in vitro*, а также ингибируют канцерогенез *in vivo* [185, 196, 234]. Также имеются данные о противоопухолевой активности препарата олипифат, который содержит продукт щелочного гидролиза и окисления лигнина с добавлением пирофосфата (в соотношении по сухой массе 25:17) [32, 47]. Различные растительные агенты, включая генистеин, куркумин, эпигаллокатехин галлат, ресвератрол и проантоцианидин, способны усиливать эффективность химиотерапевтических препаратов [289].

Нами был обнаружен собственный противоопухолевый эффект ВР-С3 при его введении в монорежиме мышам-самцам с саркомами мягких тканей. Статистически значимое торможение роста опухоли на 44-45% было зарегистрировано между 17 и 21 сутками (Таблица 42). Следует отметить, что выраженность противоопухолевого эффекта постепенно нарастала к 21 суткам, когда опыт был остановлен, и вероятно, могла бы быть большей в случае более продолжительного периода введения ВР-С3 и наблюдения за животными.

Наши данные согласуются с результатами других исследований на моделях саркомы. Так, противоопухолевая, антиоксидантная и иммунорегуляторная

активность 40%-ного этанольного элюента полифенолов из *Pinus koraiensis* (PPP-40) была показана у мышей с саркомой 180, основной противоопухолевый эффект PPP-40 был связан с активацией митохондриального апоптотического пути, усилением антиоксидантной защиты и иммунорегуляторной активностью [356]. В литературе обсуждаются различные механизмы противоопухолевого действия полифенолов. В частности, куркумин – полифенол растительного происхождения, обладает многочисленными молекулярными эффектами: подавляет транскрипцию ядерного фактора-кВ и взаимодействует с рецепторами различных факторов роста и молекулами клеточной адгезии, участвующими в росте опухоли, ангиогенезе и метастазировании [348]. Куркумин обладает радиозащитным или радиосенсибилизирующим эффектом, зависящим от дозы, и в настоящее время эти его качества активно изучаются с целью выбора оптимальных режимов его применения в качестве вспомогательного средства при радио- и химиотерапии [168]. Таким образом, препараты, содержащие полифенолы, могут рассматриваться как перспективные дополнительные средства лечения онкологических больных.

В настоящем исследовании показано, что у мышей с опухолями имело место развитие воспалительной реакции, которая характеризовалась значительным повышением уровня лейкоцитов, в основном за счет гранулоцитарного звена, что было описано и для других моделей солидных опухолей [31]. Так количество лейкоцитов у самцов мышей с саркомами мягких тканей в контрольной группе составлявшее $14,32 \pm 4,19 \times 10^9 / л$ на 0 сутки опыта увеличилось до $36,25 \pm 16,11 \times 10^9 / л$ ($p < 0,05$, приведено СКО) на 21-е сутки опыта. Повышенные уровни лейкоцитов ($15,77 \pm 11,28 \times 10^9 / л$ на 0 сутки и $26,53 \pm 15,54 \times 10^9 / л$ на 21 сутки, приведено СКО) были также зарегистрированы в группе мышей, получавшей только ВР-СЗ в течение периода наблюдения. Однако, при сравнении с начальным уровнем, эти изменения не достигли уровня статистической значимости, в отличие от картины, наблюдавшейся в контрольной группе мышей. Меньшие изменения числа лейкоцитов и гранулоцитов, наблюдаемые в группе ВР-СЗ, могут быть обусловлены торможением роста опухоли, иммуномодулирующей и / или противовоспалительной активностью этой полифенольной композиции.

Аналогичные изменения уровня лейкоцитов периферической крови наблюдались у трансгенных мышей-самок HER-2/neu с аденокарциномами молочных желез. Так в контрольной группе количество лейкоцитов увеличилось с $19,60 \pm 5,2 \times 10^9 / \text{л}$ до $37,26 \pm 14,4 \times 10^9 / \text{л}$ ($p < 0,05$, приведено СКО) за 21 день наблюдения. В то же время, в группе мышей, получавшей только ВР-С3, уровень лейкоцитов периферической крови составил на 0 и 21 сутки $14,34 \pm 6,21 \times 10^9 / \text{л}$ и $20,88 \pm 11,45 \times 10^9 / \text{л}$, соответственно ($p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой на 21 сутки, приведено СКО). Поскольку средние объемы опухолей у мышей контрольной группы и группы, получавшей ВР-С3, не различались (Таблица 49), то можно предположить, что меньший уровень лейкоцитов периферической крови у этих мышей обусловлен противовоспалительным эффектом ВР-С3.

Противовоспалительные свойства полифенолов хорошо известны. Например, карнозиновая кислота, природное полифенольное соединение, уменьшает воспаление в печени, вызванное введением ацетаминофена, посредством ингибирования сигнальных путей NF- κ B и p65 и снижения экспрессии провоспалительных генов, таких как Tnf- α , Il-1beta, Il-6 и Msp-1 [253]. Разнообразные молекулы флавоноидов, как известно, проявляют противовоспалительную активность за счет различных механизмов, в частности, антиоксидантной активности и нейтрализации активных радикалов, регуляции клеточных функций, связанных с воспалением, модуляции активности ферментов, участвующих в метаболизме арахидоновой кислоты, модуляция продукции провоспалительных молекул и / или экспрессии провоспалительных генов [149].

Проведенные в ходе исследований молекулярного состава ВР-Сх-1 химический анализ и последующая идентификация возможных активных компонентов путем поиска их молекулярных формул *in silico* в базе ChEMBL показали, что биологическая активность, вероятно, обусловлена множеством полифенольных компонентов, содержащихся в ВР-Сх-1: флавоноиды, сапогенины, фенантрены и др. Данные скрининга мишеней *in vitro* (Таблица 5) и *in silico* в качестве мишеней идентифицировали аденозиновые рецепторы, дофаминовый, рецептор DRD4, глюкокортикоидный рецептор, серотониновый рецептор 5-HT1,

рецепторы простагландина, мускариновый холинергический рецептор и рецептор ГАМК [143]. Аденозиновые, адренергические, глюкокортикоидный рецептор, гистаминовые рецепторы, ацетилхолиновые мускариновые рецепторы, пуринергические рецепторы и простаноидные рецепторы, как известно, участвуют в регуляция воспалительного ответа [161], который в его хронической форме может быть тесно ассоциирован с онкогенезом [126, 298].

В составе композиции ВР-С3 кроме полифенолов имеются и вспомогательные соединения, однако их роль в эффектах композиции ВР-С3 не велика. В частности, хорошо известно, что аскорбиновая кислота и ретинол могут использоваться при лечении злокачественных новообразований. Их биологическая активность не велика в случае наших исследований, так как их дозы составляли только 1/100 и 1/3, соответственно, от адекватного суточного потребления с пищей и были значимо ниже, чем те дозы, для которых показана активность в исследованиях *in vivo* [110]. Гомеостаз железа часто нарушается при онкологических заболеваниях, что играет важную роль в делении клеток, росте и метастазировании [19]. Анемия часто развивается из-за захвата железа опухолевыми клетками и цитостатического повреждения костного мозга. Предполагается, что провоспалительное микроокружение опухоли имеет решающее значение для накопления железа опухолевыми клетками [183]. В нашем исследовании циклофосфамид вызывал развитие анемии у мышей, а введение ВР-С3 ослабляло ее проявления, несмотря на то что содержание железа в ВР-С3 было низким и соответствовало 1/8 адекватного суточного потребления с пищей. Поскольку введение ВР-С3 предотвращало развитие хронического воспаления, ассоциированного с развитием опухоли (развитие гранулоцитоза), есть основания предполагать, что его лиганд - ВР-Сх-1 оказывает влияние на метаболизм железа в микроокружении опухоли и, тем самым, уменьшает тяжесть анемии. В частности, у мышей-самок линии FVB трансгенных по гену HER-2/neu с аденокарциномами молочных желез наблюдалась тенденция к развитию умеренной анемии: количество эритроцитов периферической крови уменьшилось с $6,39 \pm 1,15 \times 10^{12}/л$ до $4,90 \pm 1,07 \times 10^{12}/л$ к 21 суткам наблюдения ($p > 0,05$, приведено СКО). А в группе,

получавшей только ВР-С3, уровень эритроцитов периферической крови составил на 0 и 21 сутки $7,53 \pm 1,72 \times 10^{12}/л$ и $5,99 \pm 1,43 \times 10^{12}/л$, соответственно (приведено СКО).

Таким образом, наши данные в отношении нового класса соединений на основе гидролизного лигнина, свидетельствуют о том, что композиция ВР-С3 обладает всеми свойствами, характерными для полифенольных соединений. Использование таких веществ у онкологических больных может улучшить качество жизни и общую выживаемость, в частности, при паллиативной терапии пациентов. Следует отметить, что имеется опыт применения ВР-С2 у пациента с неоперабельным раком поджелудочной железы. Во время лечения режимом FOLFIRINOX в сочетании с введением ВР-С2 с 2–26 недели нейтропения не развивалась в течение 18 недель, а биохимические параметры крови нормализовались к 25 неделе [178].

Результаты наших исследований, представленные в разделе 3.3, убедительно свидетельствуют о наличии защитного эффекта ВР-С3 в отношении различных быстро обновляемых тканей организма при проведении цитостатической терапии, что расширяет современные знания о биологической активности этой группы полифенольных производных соединений лигнина и открывает перспективы для изучения потенциальной возможности клинического применения нового класса соединений.

4.2. Потенциальные терапевтические эффекты при применении композиции ВР-С2 в качестве средства сопровождения при лучевой терапии

Оценка радиозащитных свойств композиции ВР-С2 была проведена при равномерном γ -облучении всей поверхности тела на трех моделях: у крыс Вистар и мышах линий СВА и С57BL/6 с промежуточной чувствительностью к облучению [360]. Полученные данные свидетельствуют о том, что ВР-С2 оказывает

выраженное противолучевое действие при остром радиационном поражении в диапазоне среднелетальных доз (4–6 Гр). Поскольку величина ЛД₅₀ при однократном внутривенном введении составляет более 5 г/кг, изученную композицию ВР-С2 можно отнести к классу малоопасных соединений [30].

Установлено, что эффективность ВР-С2 имеет дозозависимый характер, а его оптимальная радиозащитная доза составляет 93,7 мг/кг у крыс и 81 мг/кг у мышей. Величина ФИД композиции ВР-С2, полученная в опытах на крысах составила 1,2, а в опытах на мышах 1,1. Полученные данные согласуются с работами, в которых показано, что малотоксичные вещества биологического происхождения, в том числе комплексные органические соединения металлов переменной валентности, способствуют повышению радиорезистентности организма [150, 237, 315].

Механизм противолучевого действия композиции ВР-С2, вероятно, связан со значительной перестройкой кроветворения, которая является результатом стимуляции клеток костного мозга, модификацией иммунного статуса, активацией синтеза ДНК, РНК и белков, что способствует более полной репарации радиационноиндуцированных повреждений [130, 150, 297]. Кроме того, в краткосрочном опыте на мышах С57BL/6, которым ВР-С2 вводили через 24 часа после облучения в дозе 7,0 Гр, на 8-й день после облучения ВР-С2 улучшал выживаемость животных на 40% и увеличивал среднюю продолжительность жизни на 1,5 суток. Этот паттерн характерен для радиомитигаторов, имеющих низкий ФИД и эффективных, в основном, при использовании в среднелетальном диапазоне доз облучения, что в целом позволяет отнести композицию к этому классу [8, 286, 306].

Такие препараты оказывают системное действие, ускоряя восстановление радиочувствительных тканей после облучения. Радиомитигаторы — гетерогенная группа, включающая гормональные соединения (прогестероны, эстрогены), цитокины, иммуномодуляторы и др. Многие радиомитигаторы имеют полифенольное происхождение; например, ВЮ-300 (генистеин) проявляет радиозащитную эффективность у мышей CD2F1 при остром радиационном поражении (ФИД равен 1,16), защищает популяции клеток-предшественников

костного мозга [12, 129] и оказывает противовоспалительное действие [122]. Для соединений со структурами, сходными с ВР-С2 описаны следующие радиозащитные эффекты в отношении: кроветворной системы – для розмариновой кислоты [352] и ресвератрола [220], кожи – для куркумина у мышей при γ -облучении [179]. В качестве ключевых механизмов действия таких соединений рассматриваются антиоксидантный эффект и иммунная модуляция, учитывая то, что после облучения в тканях продолжается гибель клеток, происходит высвобождение цитокинов и реализация связанных с ними эффектов, а также имеется гипоксия [86]. В частности, для ряда соединений было показано увеличение продукции Г-КСФ (G-CSF), ИЛ-6 (IL-6) – 5-АЕД (андростендиол [305]), СВЛВ502 (Entolimod, Энтолимод [195]) и гамма-токотриенол (изомер витамина Е [152, 307]).

В ходе проведенных нами исследований было выявлено, что после введения ВР-С2 абсолютное количество клеток «белой» крови у крыс опытной группы возрастает в 1,5–1,8 раза. При облучении в дозе 5,0 Гр композиция ВР-С2 оказывает радиозащитное действие в отношении показателей гемопоэза крыс. После облучения у крыс подопытной группы развивалась костномозговая форма острого радиационного поражения, но её течение было более благоприятным, чем у животных контрольной группы. При введении композиции ВР-С2 количество миелокариоцитов снижается меньше, чем в контрольной группе. Полученные результаты позволяют предполагать, что комплекс ВР-С2 обладает умеренно-выраженным противолучевым эффектом в отношении клеток предшественников гемопоэза.

Эти результаты были подтверждены в наших опытах на мышах. У мышей линий СВА и С57ВЛ/6 наблюдалось увеличение веса селезенки и количества КОЕс у животных, получавших ВР-С2, что свидетельствует о стимулирующем действии профилактико-терапевтического (до и после облучения) и лечебного (через 24 часа после облучения) введения ВР-С2 на экстрамедуллярный гематопоз. Эффект ВР-С2 не был связан с влиянием на показатели крови или клеточность костного мозга,

а вероятнее всего определяется его способностью стимулировать восстановление клеток-предшественников [107].

Этот эффект может быть связан с мобилизацией клеток-предшественников костного мозга в ответ на продукцию цитокинов под влиянием ВР-С2. Многие цитокины и факторы роста, такие как ИЛ-6, ГМ-КСФ, влияют на выживание и дифференцировку клеток-предшественников [98, 307]. К цитокинам, которые увеличивают радиорезистентность и при этом не влияют на кроветворение, но вызывают образование КОЕс, относятся ИЛ-4 и ИЛ-11 [357].

Общепризнано, что радиация вызывает повреждение ДНК, изменяет экспрессию генов, вызывает остановку митоза и индуцирует апоптоз в делящихся клетках. Наиболее чувствительной мишенью к радиационному воздействию являются клетки костного мозга [127]. Облучение влияет как на сами гемопоэтические стволовые клетки, так и на способность стромальных элементов поддерживать гематопоз и сопровождается дозозависимым подавлением костного мозга [160]. Слизистая оболочка кишечника, обладающая большой скоростью обновления и высокой митотической активностью, также является высокочувствительной тканью к облучению, что приводит к потере части делящихся клеток и крипт в ответ на облучение. Регенерация крипт и слизистой в целом зависит от жизнеспособности стволовых клеток. Полагают, что наиболее существенный вклад в рост крипты вносят быстро делящиеся Lgr5-позитивные стволовые клетки, расположенные у основания крипты среди клеток Панета [34]. Эти клетки дают начало всем клеточным линиям в криптах и ворсинках и относительно радиорезистентны по сравнению с быстро обновляющимися клетками [83, 173]. Сохранность Lgr5⁺ клеток является необходимым условием для регенерации крипты [229]. Эффективность радиопротекторов / радиомитигаторов обычно оценивается с помощью анализа гематологических показателей (лейкоцитов периферической крови) и анализа выживаемости крипт кишечника. Как правило, такие агенты эффективны только при гемопоэтических или желудочно-кишечных лучевых поражениях [306]. Гамма-токотриенол (GT3) является исключением из этого правила, поскольку при введении до облучения он

защищает мышей как от гемопоэтических, так и от желудочно-кишечных повреждений [152].

У животных, подвергшихся воздействию облучения в дозах выше 8,0 Гр, обычно развивается желудочно-кишечный синдром, который в свою очередь является фактором, значительно усложняющим лечение повреждений, вызванных летальными дозами облучения [131]. В нашей работе было выявлено защитное действие композиции ВР-С2 в отношении эпителия тонкого кишечника. Количество жизнеспособных кишечных крипт у животных, получавших ВР-С2, при облучении в диапазоне доз 5,0-8,0 Гр, было значительно выше, чем у облученных животных, получавших плацебо (Рисунок 11). Поскольку, аналогичный эффект показан нами на модели повреждения кишечного эпителия 5-ФУ при исследовании ВР-С3 (см. выше), можно полагать, что энтеропротекторный эффект полифенольного лиганда ВР-Сх-1 является универсальным. Он может быть обусловлен защитой стволовых клеток кишечника, так как количество митотически активных клеток *Igr5* + у облученных животных, получавших ВР-С2, сохранялось (Рисунок 12). С другой стороны, изучение экспрессии маркера PCNA (Рисунок 13), показало, что этот эффект не был связан с изменением скорости пролиферации клеток кишечных крипт.

Можно предположить, что ВР-С2 стимулирует выработку ИЛ-22 лимфоидными клетками врожденного иммунитета группы 3 (ILC3s) в ответ на ИЛ-1 β [111, 176] и, таким образом, усиливает пролиферацию кишечных эпителиальных клеток. Показано, что ILC3s, локализованные в непосредственной близости от кишечных крипт, необходимы для активации и пролиферации эпителия, отвечают за контроль развития вторичных бактериальных воспалительных реакций [167]. Эти клетки играют ключевую роль в защите от цитотоксического повреждения и могут являться мишенью для соединений, которые уменьшают осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта при противоопухолевой химиотерапии [71]. Необходимо отметить, что при описании клинического случая перорального применения ВР-С2 у пациента с неоперабельным раком поджелудочной железы в качестве поддерживающего лекарственного средства в сочетании с режимом

FOLFIRINOX было зарегистрировано значительное снижение побочных эффектов, связанных с желудочно-кишечным трактом [178].

Идеальное средство для противодействия радиации должно обладать несколькими важными свойствами: быть эффективным, нетоксичным, то есть, не вызывать побочных эффектов, быть пригодным для перорального приема, быть доступным и стабильным, удобным при хранении и транспортировке. Несмотря на то, что многие кандидатные вещества находятся на разных стадиях разработки, в настоящее время средства с такими характеристиками практически не описаны [306]. ВР-С2 отвечает вышеуказанным требованиям, он эффективен в диапазоне средних доз облучения, безопасен ($LD_{50}=8000$ мг/кг при пероральном введении у мышей [107]), предназначен для перорального применения, прост в обращении и стабилен при хранении при комнатной температуре более 2 лет.

Указанные выше свойства ВР-С2 дают основания для рекомендации практического профилактического применения этой композиции в группах риска при хроническом воздействии низких и средних доз радиации. Еще одним показанием к клиническому применению ВР-С2 может быть сопроводительная терапия онкологических пациентов, получающих радиотерапию, для лечения связанных с ней побочных эффектов, таких как тошнота, рвота и диарея. В настоящее время только амифостин был одобрен для клинического применения в качестве радиопротектора. Этот препарат снижает риск развития мукозита 3-4 степени, но также обладает некоторыми побочными эффектами, включая тошноту, рвоту, гипотензию и аллергические реакции [163].

Учитывая, что полифенольный лиганд обладает антиоксидантными свойствами, можно предположить его потенциальную способность уменьшать эффективность лучевой терапии опухолей. В настоящее время, имея ограниченные данные, большинство радиационных онкологов советует пациентам воздерживаться от приема антиоксидантных средств во время лучевой терапии. Другие, однако, полагают, что осторожное использование антиоксидантов может быть полезным для пациента с целью поддерживать хорошее качество жизни [100].

Нами проведены опыты по лучевой терапии на двух моделях опухолевого роста.

На модели лимфосаркомы Плисса у крыс проводили облучение всего тела в дозе $LD_{50/30}$ – 5 Гр, способ облучения был выбран для моделирования неблагоприятных эффектов лучевого воздействия не только в отношении опухоли, но и здоровых тканей. Выживаемость облученных крыс соответствовала $LD_{50/30}$, а выживаемость крыс с опухолью была меньше, чем животных без опухоли, подвергнутых облучению (СПЖ= $19,7 \pm 10,7$, $p=0,063$). Облученные животные, которым предварительно перевивали опухоль, погибали, не дожив до конца 30-дневного периода наблюдения. При этом СПЖ крыс с лимфосаркомой от дня рандомизации в группы составила $11,5 \pm 3,7$ суток, а облученных крыс с лимфосаркомой – $8,1 \pm 3,1$ суток ($P < 0,0001$). Введение композиции ВР-С2 не оказало влияния на выживаемость крыс с лимфосаркомой при облучении (СПЖ= $8,7 \pm 3,1$ суток).

Выявлено, что облучение животных с привитой лимфосаркомой Плисса приводило к замедленному развитию опухолевого процесса (Таблица 18). Так объем опухоли у облученных животных был на 59 % и 44 % меньше, соответственно на 4 и 7 сутки после облучения (11 и 14 сутки после перевивки опухоли), чем значения, полученные в контрольной группе крыс. Степень торможения роста в группе облученных животных с опухолью, получавших ВР-С2, достоверно не отличалась от животных, не получавших композицию, но была несколько ниже и составила 40 % и 37 %, соответственно.

Наши данные о продолжительности жизни и торможении роста опухоли свидетельствуют об отсутствии выраженного уменьшения эффективности радиотерапии на этой модели.

Дальнейшие исследования показали, что изменения клеточного состава периферической крови крыс носили черты, характерные для костномозговой формы острой лучевой болезни (Таблица 19). У животных, которым перевивали опухоль, на протяжении всего срока исследования, отмечали увеличение количества лейкоцитов в периферической крови в 1,1 – 1,5 раза по сравнению с

интактным контролем. Облучение крыс с перевитой опухолью приводило к снижению уже на 4 сутки числа лейкоцитов до уровня $3,8 \pm 0,4 \times 10^9/\text{л}$. Степень лейкопении у таких животных соответствовала таковой у облученного контроля без опухоли ($3,4 \pm 0,5 \times 10^9/\text{л}$). При введении облученным крысам с лимфосаркомой ВР-С2 количество лейкоцитов периферической крови к 4 суткам составило $9,1 \pm 0,7 \times 10^9/\text{л}$, однако, в более поздние сроки количество лейкоцитов у облученных крыс с опухолью, как получавших ВР-С2, так и без него, продолжало снижаться, что, вероятно, наряду с прогрессирующим ростом опухоли послужило причиной более быстрой гибели животных. Это могло быть связано с уменьшением адаптационных возможностей организма животных с привитой лимфосаркомой Плисса. Следует отметить, масса тела животных с опухолью увеличивалась пропорционально срокам исследования и превышала значения, полученные у интактных крыс, на 17–50 %, что связано с увеличением размеров самой опухоли. Облучение таких животных не приводило к резкому снижению их веса, а введение ВР-С2 оказывало защитный эффект в отношении снижения массы тела облученных животных с опухолью.

На модели аденокарциномы толстого кишечника мышей АКАТОЛ проводили локальное облучение опухоли протонами с энергией 1000 МэВ стереотаксическим методом, поглощённая доза 10 Гр. Анализ результатов оценки средней продолжительности жизни мышей с перевитой аденокарциномой толстой кишки показал, что включение в схему лучевой терапии опухоли исследуемой композиции ВР-С2 в дозе 90 мг/кг как при лечебной, так и при лечебно-профилактической схемах применения, приводило к некоторому снижению эффективности противоопухолевого лечения (УПЖ облученных мышей составило 30,7%, а при введении ВР-С2 – 5,1% и 9,8 % соответственно схеме применения). Аналогичные данные были получены при анализе динамики объема опухолевого узла (Таблица 21). Показатель торможения роста опухоли при сочетании облучения с ВР-С2 вне зависимости от режима применения был несколько меньше, чем при применении только лучевого воздействия на опухоль.

Гематологический анализ подтвердил отсутствие выраженного системного действия используемого метода лучевой терапии. У животных с опухолью после облучения отмечено меньшее относительное содержание моноцитов на 20 сутки после облучения, а при введении ВР-С2 вне зависимости от режима их уровень не отличался от показателя контрольной группы.

Оценка содержания в крови мышей с развивающейся опухолью уровня интерлейкина-1 β – маркера интенсивности воспалительных процессов, показала существенное увеличение этого показателя при развитии новообразования, усугубляющееся лучевой терапией (Таблица 24). При применении радиопротекторной композиции ВР-С2 наблюдалось выраженное уменьшение продукции ИЛ-1 β , более значимое при использовании ее в лечебно-профилактическом режиме. Заметим, что в отношении этого провоспалительного цитокина имеются данные о его радиозащитном эффекте при общем облучении у мышей [28]. Это позволяет предположить, что увеличение продукции ИЛ-1 β может быть адаптационной реакцией организма на облучение, а снижение его продукции способствовать увеличению эффекта радиации и/или приводить к уменьшению связанного с радиационным повреждением воспалительного ответа.

В этом отношении стоит упомянуть данные исследования Fares et al. (2018) в отношении местного применения ВР-С2 для профилактики и лечения лучевого дерматита [142]. После воздействия дозы облучения 30 Гр на правую заднюю ногу самцов мышей BALB/cfC3H наблюдался острый кожный дерматит у всех контрольных животных. При нанесении на кожу ВР-С2 до облучения никаких признаков кожного дерматита в облученной области у животных не наблюдалось. А при лечении животных с развившимся поражением кожи, аппликация ВР-С2 три раза в неделю приводила к восстановлению целостности кожного покрова, и в дальнейшем эритема или изъязвление не наблюдались [142].

Таким образом, при оценке лучевой терапии в сочетании с ВР-С2 нами получены данные о некотором снижении её эффективности, что согласуется с представлениями о свойствах других антиоксидантных соединений [205]. Наши данные о противовоспалительном действии ВР-С2, и литературные сведения о

возможности коррекции развития одного из самых частых осложнений радиотерапии – лучевого дерматита, требуют исследований, позволяющих дать оценку риска и пользы от его применения. Доклинические модели дают только ограниченное представление о клинической значимости в силу биологических и физических ограничений моделирования на животных [191]. Кроме этого, показано, что с радиационно-индуцированными кожными реакциями связаны воспаление и окислительный стресс, причем воспалительный ответ и окислительный стресс взаимодействуют и способствуют друг другу при развитии радиационно-индуцированных кожных реакций, а отдаленные эффекты в большей степени зависят от типа, площади, объема, размера фракции и режима облучения, а не от общей дозы облучения [345]. Поскольку ВР-С2 оказывает противовоспалительное и антиоксидантное действие, обладает эффективностью в отношении радиационных повреждений, польза от его применения при изменении способа введения, режима или дозы может превышать риски. Для оценки клинической значимости необходимо проведение клинических исследований 1-й фазы.

Еще одним потенциальным показанием к применению ВР-С2 может быть использование его в качестве профилактического средства в отношении вторичных опухолей, индуцированных радиационным воздействием, что обусловлено его низкой токсичностью и радиозащитной эффективностью в среднелетальном диапазоне доз, а также антиканцерогенным потенциалом полифенольного лиганда, который был получен у мышей SHR в отношении спонтанных опухолей (см. раздел 3.4). Поиск таких средств является актуальной и нерешенной задачей [285].

Результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод о наличии радиопротекторных свойств у композиции ВР-С2 и о перспективности применения у онкологических пациентов. Показания и терапевтический потенциал полифенольных композиций на основе гидролизного лигнина являются предметом будущих исследований.

4.3. Безопасность длительного применения ВР-С3 и ВР-С2

Вещества растительного происхождения, в частности полифенолы, рассматриваются как многообещающие средства, что обусловлено их низкой токсичностью и практически отсутствием побочных эффектов, в отличие от синтетических препаратов, которые в настоящее время используются в клинической практике для уменьшения побочных эффектов химиотерапии [289]. Для оценки безопасности препаратов проводят изучение острой, хронической токсичности, канцерогенности в опытах на лабораторных грызунах [37].

Нами была проведена оценка токсичности и фармакокинетики композиции ВР-С2 по уровню содержания молибдена в крови и тканях крыс при её субхроническом введении. Установлено, что введение ВР-С2 в течение 6 недель в кумулятивной дозе 4200 мг/кг не сопровождается клиническими проявлениями токсического действия, изменениями гемограммы или биохимических показателей крови. Исключением является только некоторое увеличение активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови. При введении в суточной дозе 100 мг/кг стационарная концентрация (около 1000 мкг Мо/л крови) устанавливалась на 10-12 день, а при введении в дозе 200 мг/кг ВР-С2 в сутки наблюдалось увеличение равновесной концентрации Мо (около 4000 мкг Мо/л) и времени ее достижения (12-13 дней). Отсутствие стационарной концентрации и дозовой зависимости при введении ВР-С2 позволяет предположить появление изменений в пути элиминации молибдена. Максимальное накопление Мо выявлено в почках. Низкие концентрации Мо были обнаружены в мозге и печени, значительные количества - в яичниках и мышцах. При гистологическом исследовании печени и почек специфических изменений не было выявлено. Таким образом, установлено, что ВР-С2 имеет относительно короткий период полувыведения из крови ($T_{1/2} \approx 7$ дней) и тканей, а курсовое введение повышенных доз ВР-С2 является безопасным.

Безопасность длительного применения полифенолов на основе гидролизного лигнина была оценена в опыте на канцерогенность у мышей самок линии SHR, при пожизненном введении им ВР-С3 с питьевой водой.

Полученные в исследовании результаты свидетельствуют, в первую очередь, о том, что длительное/хроническое введение самкам мышей линии SHR композиции ВР-СЗ не оказывает токсического, или какого-либо иного негативного эффекта на состояние этих животных. Средняя продолжительность жизни животных, получавших ВР-СЗ, увеличилась на ~50 суток, по сравнению с контрольной группой [261]. При этом в группе ВР-СЗ наблюдалось большее количество мышей без опухолей и отсроченное возрастное выключение эстральной функции.

Зарегистрировано снижение ректальной температуры тела на протяжении всей жизни мышей, получавших ВР-СЗ по сравнению с контрольными животными. Трансгенные мыши со сниженной на 0,5 °С температурой ядра живут дольше, чем мыши дикого типа [124]. У мышей, получавших ВР-СЗ, мы наблюдали снижение температуры тела в диапазоне 0,2-0,4 °С. Долговременная снижение температуры тела и связанное с ним замедление метаболических процессов, как известно, увеличивает продолжительность жизни животных, подвергшихся ограничению калорийности питания, при введении мелатонина или дипептида Lys-Glu [60, 61, 346]. Эти соединения обладают некоторыми иммуномодулирующими свойствами.

Параметры функции репродуктивной системы могут служить неинвазивным и адекватным способом оценки биологического возраста животных [70]. Одним из них является длительность эстрального (овуляторного) цикла, которая увеличивается с возрастом у мышей и крыс. У грызунов большинства линий со спонтанной овуляцией эстральная функция обычно прекращается в возрасте 13-17 месяцев, наступают периоды персистирующих эструса и анэструса, что являющаяся эквивалентом климактерического периода и менопаузы. С возрастом доля мышей с регулярными эстральными циклами постепенно уменьшается. Сравнительный анализ эстральной функции показал способность ВР-СЗ замедлять старение репродуктивной системы, что проявлялось как относительно большей частотой регулярных циклов у животных в возрасте 13,5-19,5 месяцев, так и замедленным увеличением длительности эстральных циклов у животных, получавших ВР-СЗ.

Для некоторых других соединений и препаратов с геропротекторной активностью также была показана способность замедлять возрастное выключение эстральной функции у мышей и крыс: мелатонин, полипептид шиповника, препарат эпиталамин, синтетический тетрапептид Ала-Глу-Асп-Гли, нейропротекторный индуцирующий дельта-сон пептид (Три-Ала-Гли-Гли-Асп-Ала-Сер-Гли-Глу), антидиабетические бигуаниды буформин, фенформин и метформин, митохондриально-направленный пластохинонсодержащий антиоксидантный препарат SkQ1 и некоторые другие [59, 62–65, 273]. Фармакологически активные соединения разных классов, с разной биологической активностью и различными специфическими механизмами действия в отношении старения, можно рассматривать как средства против старения. Стоит отметить, что эти препараты обладают антиоксидантной активностью.

Продолжительность жизни животных без опухолей, получавших ВР-СЗ, была значительно больше (на 2,3 месяца) по сравнению с контролем. Структура неопухолевой патологии была сходной как в контроле, так и в группе мышей при введении ВР-СЗ. Это позволяет предполагать, что ВР-СЗ обладает способностью замедлять старение иммунной системы. Возрастное ухудшение функций иммунной системы сопровождается снижением способности моноцитов и дендритных клеток распознавать свои нативные (опухолевые) или чужеродные (вирусные) антигены и иммуногенного представления антигенов Т-лимфоцитами, уменьшением количества наивных Т- и НК-клеток и увеличением количества Т-лимфоцитов с истощенными функциональными возможностями [89, 188]. Такие изменения тесно связаны с дисбалансом в субпопуляциях Т-лимфоцитов и низкой вероятностью иммунного ответа на новые антигены [146]. Функциональная активность Т-клеток и макрофагов, которая уменьшается с возрастом и ассоциирована со сниженной противовирусной, антибактериальной и противоопухолевой защитой организма, напрямую связана со снижением продукции ИЛ-2 [252]. В наших исследованиях показано, что ВР-СЗ обладает противовоспалительными свойствами, характерными для многих полифенолов [55, 138, 149]. Таким образом, есть основания полагать, что иммуномодуляторные

свойства ВР-СЗ могут влиять на старение иммунной системы животных. Однако, у молодых мышей-самцов ВР-СЗ не оказывал влияния на субпопуляции лимфоцитов периферической крови, но способствовал уменьшению воспалительного ответа на повреждение в разных моделях.

В нашем исследовании впервые показано, что полифенольная композиция ВР-СЗ, наряду с увеличением продолжительности жизни, также подавляет спонтанный канцерогенез. У мышей, при введении ВР-СЗ, первые опухоли появились на 1,5 месяца позже, чем в контрольной группе. Обнаружена достаточно выраженная тенденция к снижению заболеваемости и множественности опухолей у мышей, получавших ВР-СЗ. Эти данные свидетельствуют о профилактическом потенциале композиции ВР-СЗ в отношении злокачественных новообразований. Как и ряд других геропротекторов, ВР-СЗ обладает истинным антиканцерогенным эффектом. Подавляющее действие геропротекторов на канцерогенез было продемонстрировано на ряде моделей, в которых оно было в основном реализовано путем нормализации гормонально-метаболических и иммунологических показателей, уровней окислительного стресса, пролиферативного и провоспалительного статуса [59, 64, 93–96]. Полученные результаты согласуются с данными об эффектах лигфола, производного лигнина, при радиационно-ртутном воздействии на крыс [18]. Как немодифицированные, так и биологически модифицированные лигнины исследовались в качестве химиофилактических средств в отношении развития онкологических заболеваний. Лигнины обеспечивают высокую степень защиты ДНК от окислительного повреждения за счет удаления радикалов ОН и снижения алкилирующей активности повреждающих агентов [193, 199], вследствие аффинной сорбции лигнином N-нитрозосоединений [231]. Антигенотоксичная активность лигнина показана для различных генотоксичных соединений [139].

Таким образом, в результате проведенного исследования на мышках-самках SHR при пожизненном введении ВР-СЗ показана не только высокая безопасность этой композиции, но также впервые установлена ее геропротекторная и антиканцерогенная активность.

Выводы

1. В результате проведенного исследования охарактеризован новый класс препаратов на основе продуктов гидролизного лигнина. Обоснована возможность их применения в качестве сопроводительных средств при химио- и лучевой терапии злокачественных новообразований.
2. На панели Diversity Profile P9 выявлено, что ВР-Сх-1 существенно (ингибирование >50%) взаимодействует с 24 мишенями. Поиск по молекулярным формулам *in silico* в базе ChEMBL и сопоставление с активностью *in vitro* на панели мишеней позволили выявить основные активные компоненты (ряд полифенольных соединений: флавоноиды, сапогенины, фенантрены и др.). Оба метода идентифицировали в качестве мишеней аденозиновые рецепторы A1 и A2, дофаминовый рецептор DRD4, глюкокортикоидный рецептор GR, серотониновый рецептор 5-HT1, рецепторы простагландина EP2 и I2, мускариновый холинергический рецептор CHRМ1 и рецептор GABRA1.
3. Установлено, что при системном (внутривенном) введении полифенольного лиганда ВР-Сх-1 в дозе 100 мг/кг мышам, органами преимущественного накопления являются легкие, печень, почки и селезенка, при пероральном введении концентрации в органах животных на несколько порядков меньше. При пероральном введении полифенольный лиганд характеризуется низкой абсолютной биодоступностью (~1,5%).
4. Композиция ВР-С3 при введении животным оказывает защитное действие в отношении повреждения различных тканей, развивающегося при воздействии химиопрепаратов различных групп. Ее биологическая активность опосредована стимуляцией экстрамедуллярного гемопоэза, защитой органов лимфопоэза и кишечного эпителия, антиоксидантным и противовоспалительным действием. Оптимальная доза композиции составляет 80 мг/кг веса тела перорально для мышей.

5. ВР-С3 не снижает эффективность противоопухолевого лечения сарком мягких тканей циклофосфамидом и аденокарцином молочной железы схемой САФ (циклофосфамид + доксорубицин + 5-фторурацил), гемцитабином, комбинацией гемцитабина с цисплатином. При сочетании ВР-С3 с гемцитабином частота стабилизаций увеличилась на 20%, составив 30% ($p=0,2607$ по сравнению с контролем). При сочетании ВР-С3 с комбинацией гемцитабина с цисплатином частота стабилизаций не изменилась (33,3%, $p=0,4832$ по сравнению с контролем), как и при сочетании ВР-С3 со схемой САФ (64,3%, $p=0,0026$ по сравнению с контролем). У самцов мышей с саркомами мягких тканей, индуцированных бензо(а)пиреном, ВР-С3 оказывает собственное противоопухолевое действие (торможение роста опухоли 45%, $p<0,05$).
6. Многократное внутрижелудочное введение ВР-С2 оказывает противолучевое действие при общем γ -облучении в среднелетальном диапазоне доз. Оптимальная радиозащитная доза для крыс составляет 93,7 мг/кг, величина ФИД — 1,2. Оптимальная радиозащитная доза для мышей составляет 81 мг/кг, величина ФИД — 1,1. Механизм действия ВР-С2 включает стимуляцию гемопоеза, защиту кишечного эпителия и стволовых клеток LGR5 крипт, а также противовоспалительный эффект. Композиция ВР-С2 относится к классу малоопасных веществ, применение композиции ВР-С2 в течение 6 недель в кумулятивной дозе 4200 мг/кг не сопровождается клиническими проявлениями, изменениями гемограммы или биохимических показателей крови крыс.
7. Выявлено, что при гамма-облучении крыс с лимфосаркомой Плисса торможение роста опухоли достигало 59 % ($p<0,05$ по сравнению с контролем), а у животных, получавших ВР-С2, – 40 % ($p<0,05$ по сравнению с контролем), средняя продолжительность жизни облученных животных с опухолью не отличалась. При введении ВР-С2, выявлен защитный эффект в отношении снижения массы тела облученных крыс с опухолью и развития постлучевой лейкопении (в 1,8 раза) в ранние сроки после облучения животных. На модели аденокарциномы толстого кишечника мышей АКАТОЛ при облучении

опухоли протонами высокой энергии показано, что ВР-С2 приводит к меньшему увеличению продолжительности жизни облученных мышей (УПЖ облученных мышей с опухолью 30,7 % ($p < 0,05$), при введении ВР-С2 не более 9,8 %). При применении ВР-С2 происходит нормализация уровня провоспалительного цитокина IL-1 β ($210,7 \pm 19,5$ нг/мл у облученных мышей с опухолью, при введении ВР-С2 $127,9 \pm 21,4$ нг/мл, $p < 0,05$ на 20 сутки после облучения).

8. При оценке канцерогенной безопасности установлено, что длительное введение ВР-С3 самкам мышей SHR угнетает спонтанный канцерогенез и обладает геропротекторным действием, проявляющимся в увеличении продолжительности жизни, замедлении возрастного выключения эстрального цикла. Общее количество опухолей у животных группы, получавшей ВР-С3, составило 21 случая против 34 в контроле. Максимальная продолжительность жизни мышей под влиянием композиции увеличивалась на 73 дня (на 9,1%); средняя продолжительность жизни – на 50 дней (8,4%, $p < 0,05$); средняя продолжительность жизни последних 10% выживших мышей – на 95 дней (12,4%, $p < 0,01$).

Практические рекомендации

1. Композиция ВР-С3 может быть рекомендована для внедрения в клиническую практику после завершения необходимого комплекса исследований общетоксического действия, проведения клинических исследований, в качестве перспективного средства сопроводительного лечения онкологических пациентов для уменьшения токсического действия химиотерапии, проявляющегося в повреждении органов гемопоэза, кишечного эпителия.
2. Композиция ВР-С3 обладает геропротекторным и антиканцерогенным действием, что обуславливает ее потенциал для использования в качестве

средства химиопрофилактики первичных и вторичных новообразований у человека.

3. Композиция ВР-С2 обладает радиопротекторной эффективностью в среднелетальном диапазоне доз, что, наряду с ее высокой безопасностью, позволяет рекомендовать ее в качестве потенциального средства для профилактики негативных эффектов хронического радиационного воздействия в группах риска.

Перспективы разработки данной темы

Данные о клеточных мишенях производных гидролизного лигнина и о его биологической активности расширяют фундаментальные представления о потенциале этого класса соединений, позволяют вести поиск и отбор уникальных соединений с необходимыми свойствами, создают базу для развития фармакологии этого класса соединений.

Поскольку полифенольный лиганд ВР-Сх-1 может изменять фармакокинетику тяжелых металлов, уменьшать токсические эффекты ксенобиотиков, могут быть проведены различные токсикологические и фармакологические исследования по модификации свойств и эффектов как лекарственных препаратов, так и промышленных токсикантов. Открывается перспективность новых исследований применения производных гидролизного лигнина не только в медицине, но также в ветеринарии, сельском хозяйстве.

Предложенный метод оценки фармакокинетики сложных полифенольных композиций, заключающийся во введении тритиевой метки в структуру соединений, может быть применен для изучения биодоступности, распределения и выведения подобных соединений.

Радиопротекторные и противовоспалительные свойства композиции ВР-С2 позволяют рассматривать ее в качестве потенциального средства профилактики осложнений лучевой терапии. Это определяет дополнительное направление

исследований доз и режимов ее применения на доклинических моделях для комплексной оценки потенциального соотношения пользы и риска с точки зрения влияния как на частоту развития побочных эффектов, так и на отдаленные результаты основного лечения.

Геропротекторный эффект композиции ВР-СЗ у мышей SHR, сочетающий увеличение продолжительности жизни, угнетение спонтанного канцерогенеза и замедление старения репродуктивной функции, позволяет рассматривать эту композицию в качестве средства профилактики старения населения. Это определяет необходимость дальнейших исследований в этом направлении.

Сокращения и условные обозначения

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

ВЭЖХ МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

К₂ЭДТА – этилендиаминтетраацетат калия

КОЕс – колониеобразующая единица селезенки

ЛД₅₀ – полулетальная доза

ЛД_{50/30} – полулетальная поглощенная доза радиации при периоде наблюдения 30 суток

МДА – малоновый диальдегид

МС ИЦРПФ – масс-спектрометрия высокого разрешения ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье

ОРП – острое радиационное поражение

СКО – среднеквадратичное (стандартное) отклонение

СОД – супероксиддисмутаза

СПЖ – средняя продолжительность жизни

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТРО – торможение роста опухоли

УПЖ – увеличение продолжительности жизни

5-ФУ – 5-фторурацил

ФИД – фактор изменения дозы

ЦФ – циклофосфамид

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

AUC (Area Under the Curve) – площадь под кривой

CAF – режим полихимиотерапии, включающий циклофосфамид, адриамицин, 5-фторурацил

FDA (Food and Drug Administration) – Управление по контролю за продуктами и лекарствами США

M – среднее значение показателя

m – стандартная ошибка среднего

N – число животных в группе

SF-ICP-MS – магнитно-секторная масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

$T_{1/2}$ – период полувыведения

T_{\max} – время достижения максимальной концентрации

Список литературы

1. Аникин И.В. [и др.]. Влияние эpsilon-аминокапроновой кислоты, циклофосфида и их комбинации на рост аутохтонных индуцированных бенз(а)пиреном сарком мышей // Вопросы онкологии. – 2014. – Т. 60. – № 1. – С. 94-95.
2. Анисимов В.Н. [и др.]. Современные подходы к изучению канцерогенной безопасности, противоопухолевой, антиканцерогенной и геропротекторной активности фармакологических препаратов // Вопросы онкологии. – 2012. – Т. 58. – № 1. – С. 7-18.
3. Анисимов В.Н. [и др.]. Фармакологическая геропротекторная композиция и способ ее получения: пат. 2522547 Российская Федерация // 2014. ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава России, ООО «Нобель» – № 2012147985/15; заявл. 12.11.2012; опубл. 20.07.2014 Бюл. № 20. - 10 с.
4. Анисимович И.П. [и др.]. Параметры антиоксидантной активности соединений: относительная антиоксидантная активность чая // Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки. – 2010. – Т. 11. – № 9. – С. 104-110.
5. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека / В.А. Барабой. – Москва: Наука, 1984. – 160 с.
6. Бардычев М.С. Лечение местных лучевых повреждений с помощью активатора местного иммунитета / М.С. Бардычев // Русский медицинский журнал. – 2003. – Т. 11. – № 11. – С. 646.
7. Башарин В.А. [и др.]. Экспериментальная оценка влияния синтетического генистеина на гематологические показатели и цитокиновый статус облученных крыс // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2015. – Т. 55. – № 2. – С. 160-168.
8. Васин М.В. Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии /

М.В. Васин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т. 53. – № 5. – С. 459-467.

9. Владимиров В.Г. Радиопротекторы: структура и функция / В.Г. Владимиров, И.И. Красильников, О.В. Арапов. – Киев: Наук. думка, 1989. – 182-186 с.

10. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, И.М. Арчаков. – Москва: Наука, 1972. – 241-242 с.

11. Владимирова Л.Ю. [и др.]. Практические рекомендации по профилактике и лечению тошноты и рвоты у онкологических больных // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. – 2018. – Т. 8. – № 3, спецвыпуск 2. – С. 502-511.

12. Гребенюк А.Н. [и др.]. Экспериментальная оценка радиозащитной эффективности генистеина по показателям выживаемости и костномозгового кроветворения мышей, подвергнутых рентгеновскому облучению // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2013. – Т. 53. – № 5. – С. 468-474.

13. Гребенюк А.Н. Перспективы использования радиопротекторов для повышения эффективности медицинской противорадиационной защиты Вооруженных сил / А.Н. Гребенюк, В.И. Легеза // Военно-медицинский журнал. – 2013. – Т. 334. – № 7. – С. 46-50.

14. Громова Е.Г. [и др.]. Практические рекомендации по коррекции нефротоксичности противоопухолевых препаратов // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. – 2018. – Т. 8. – № 3, спецвыпуск 2. – С. 591-603.

15. Джиссман Т.А. Биогенез фенолов растительного происхождения / Т.А. Джиссман // Биогенез природных соединений. – Москва: Мир, 1965. – С. 482-529.

16. Зефирова Н.С. Химическая энциклопедия : в 5 т. Т. 5 / Н.С. Зефирова. – Москва: Научное издательство «Большая Российская энциклопедия», 1998. – 783 с.

17. Иванов С.Д. [и др.] Радиобиологические эффекты олипифата при лучевых воздействиях // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – Т. 140. – № 10. – С. 429-432.

18. Иванов С.Д. [и др.] Эффекты лигфола при радиационно-ртутном воздействии на крыс разных возрастных групп // Успехи геронтологии. – 2007. – Т. 20. – № 4. – С. 64-67.
19. Иванов С.Д. Железо и рак: роль ионов железа в процессе канцерогенеза и при лучевой терапии опухоленосителей / С.Д. Иванов // Успехи современной биологии. – 2013. – Т. 133. – № 5. – С. 481-494.
20. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии / Я.М. Кабак. – Москва: Изд-во МГУ, 1968. – 146 с.
21. Кабиев О.К. Природные фенолы - перспективный класс противоопухолевых и радиопотенцирующих соединений / О.К. Кабиев, С.Б. Балмуханов. – Москва: Медицина, 1975. – 192 с.
22. Канаев С.В. Роль лучевой терапии в лечении рака молочной железы / С.В. Канаев // Практическая онкология. – 2002. – Т. 3. – № 1. – С. 45-51.
23. Кондратьев В.Б. Осложнения химиотерапии рака ободочной кишки и методы их лечения / В.Б. Кондратьев // Практическая онкология. – 2000. – № 1. – С. 31-36.
24. Кондратьев В.Б. Лечение и профилактика осложнений химиотерапии препаратами платины и таксанами / В.Б. Кондратьев, Н.А. Карасева // Практическая онкология. – 2000. – № 3. – С. 38-42.
25. Королюк М.А. [и др.]. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
26. Лигнин гидролизный (Ligninum hydrolisatum) – описание вещества, инструкция, применение, противопоказания и формула. [Электронный ресурс]. – URL: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_2851.htm (дата обращения: 14.04.2019).
27. Маркова Е.О. [и др.]. Комплексное соединение аскорбиновой кислоты с антигипоксантами и антиоксидантными свойствами. // Вестник смоленской государственной медицинской академии. – 2013. – Т. 1. – № 12. – С. 27-32.
28. Мурзина Е.В. [и др.]. Противолучевая эффективность рекомбинантных флагеллина и интерлейкина-1 бета при совместном применении // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52. – № 10. – С. 18-21.

29. Орлова Р.В. [и др.]. Практические рекомендации по лечению анемии при злокачественных новообразованиях // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. – 2018. – Т. 8. – № 3, спецвыпуск 2. – С. 494-501.
30. Панченко А.В. [и др.]. Экспериментальное изучение радиозащитной эффективности комплекса полифенольного полимерного производного лигнина с молибдатом аммония - препарата ВР-С2 // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2017. – Т. 57. – № 5. – С. 505-511.
31. Панченко А.В. [и др.]. Моделирование солидного рака печени у кролика // Вопросы онкологии. – 2017. – Т. 63. – № 5. – С. 785-791.
32. Петухов Д.В. [и др.]. Противоопухолевое средство «Олипифат» и способ его получения: пат. 2141335 Российская Федерация // 1999. ООО «Лигфарм» – № 98123959/14; заявл. 30.12.1998; опубл. 20.11.1999 – 4 с.
33. Практические рекомендации Российского общества клинической онкологии. Поддерживающая терапия в онкологии / О.А. Гладков (отв. ред.) [и др.]. // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. – 2018. – Т. 8. – № 3, спецвыпуск 2. – С. 493-665.
34. Проскуряков С.Я. [и др.]. Где локализованы стволовые клетки кишечного эпителия? О молекулярных маркерах // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 4. – С. 359-373.
35. Ронин В.С. Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований / В.С. Ронин, Г.М. Старобинец, Н.Л. Утевский. – Москва: Медицина, 1982. – 320 с.
36. Рубцов В.И. [и др.]. Организация индивидуальной защиты персонала при проведении диагностических и лечебных процедур с использованием радионуклидных и генерирующих источников ионизирующего излучения // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2017. – Т. 62. – № 5. – С. 28-32.

37. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. : в 2 т. Т. 1 / А.Н. Миронов (отв. ред.) [и др.]. – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.

38. Сакаева Д.Д. Практические рекомендации по лечению инфекционных осложнений фебрильной нейтропении и назначению колониестимулирующих факторов у онкологических больных / Д.Д. Сакаева, Р.В. Орлова, М.М. Шабаетова // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. – 2018. – Т. 8. – № 3, спецвыпуск 2. – С. 521-530.

39. Семенова А.И. Кардио- и нейротоксичность противоопухолевых препаратов (патогенез, клиника, профилактика, лечение) / А.И. Семенова // Практическая онкология. – 2009. – Т. 10. – № 3. – С. 168-176.

40. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т.В. Сирота // Вопросы медицинской химии. – 1999. – № 3. – С. 263-272.

41. Телетаева Г.М. Профилактика и лечение желудочно-кишечных осложнений лекарственной терапии (тошнота и рвота, мукозиты, диарея) / Г.М. Телетаева // Практическая онкология. – 2009. – Т. 10. – № 3. – С. 158-167.

42. Теселкин Ю.О. [и др.]. Антиоксидантное действие дигидрокверцетина при тетрахлорометановом гепатите у крыс // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 1999. – № 3. – С. 44-47.

43. Тиунов Л.А. Противолучевые средства / Л.А. Тиунов, Г.А. Васильев, Э.А. Вальдштейн. – М.-Л., 1964. – 137 с.

44. Ткаченко П.Е. Клинические рекомендации по коррекции гепатотоксичности, индуцированной противоопухолевой терапией / П.Е. Ткаченко, В.Т. Ивашкин, М.В. Маевская // Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. – 2018. – Т. 8. – № 3, спецвыпуск 2. – С. 531-544.

45. Трещалина Е.М. [и др.]. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. : в 2 т. – Москва: Гриф и К, 2012. – Т. 1. – С. 640-654.

46. Тулаева Л.А. Синтез и свойства водорастворимых производных хлорина e_6 / Л.А. Тулаева // Химия растительного сырья. – 2002. – № 2. – С. 85-88.
47. Филов В.А. [и др.] Экспериментальное изучение противоопухолевой активности олипифата // Вопросы онкологии. – 2000. – Т. 46. – № 3. – С. 332-336.
48. Филов В.А. Лигнин: краткий очерк химизма и возможностей медико-биологического использования / В.А. Филов // Опыт доклинического исследования на примере олипифата / ред. В.А. Филов, А.М. Беркович. – Санкт-Петербург: НИКА, 2002. – С. 230-237.
49. Эмануэль Н.М. Торможение процессов окисления жиров / Н.М. Эмануэль, Ю.Н. Лясковская. – Москва: Пищепромиздат, 1961. – 359 с.
50. Юнкеров В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. – Санкт-Петербург: ВМедА, 2002. – 266 с.
51. Ярмоненко С.П. Радиобиология - ответы на запросы времени / С.П. Ярмоненко // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2006. – Т. 51. – № 1. – С. 8-14.
52. Achinivu E.C. Protic ionic liquids for lignin extraction — A lignin characterization study / E.C. Achinivu // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Т. 19. – № 2. – С. 428.
53. Adler E. Lignin chemistry—past, present and future / E. Adler // Wood Science and Technology. – 1977. – Т. 11. – № 3. – С. 169-218.
54. Akkari R. [и др.]. Recent progress in the development of adenosine receptor ligands as antiinflammatory drugs // Current Topics in Medicinal Chemistry. – 2006. – Т. 6. – № 13. – С. 1375-1399.
55. Akyol S. [и др.]. Can propolis and caffeic acid phenethyl ester be promising agents against cyclophosphamide toxicity? // Journal of Intercultural Ethnopharmacology. – 2016. – Т. 5. – № 1. – С. 105-107.
56. Ale-Ebrahim M. [и др.]. Hepatoprotective and antifibrotic effects of sodium molybdate in a rat model of bile duct ligation // Journal of trace elements in medicine and

biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS). – 2015. – Т. 29. – С. 242-248.

57. Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking. Springer Series in Wood Science. – New-York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999. – 304 с.

58. Andrei G. [и др.]. Topical Tenofovir, a microbicide effective against HIV, inhibits herpes simplex virus-2 replication // *Cell host & microbe*. – 2011. – Т. 10. – № 4. – С. 379-389.

59. Anisimov V. Carcinogenesis and Aging. Vols. 1 and 2. : в 2 т. Тт. 1, 2 / V. Anisimov. – Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., 1987. – V.1 – 168 p.; V.2 – 146 p. с.

60. Anisimov V.N. [и др.]. Effect of synthetic thymic and pineal peptides on biomarkers of ageing, survival and spontaneous tumour incidence in female CBA mice // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2001. – Т. 122. – № 1. – С. 41-68.

61. Anisimov V.N. [и др.]. Melatonin increases both life span and tumor incidence in female CBA mice // *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*. – 2001. – Т. 56. – № 7. – С. B311-323.

62. Anisimov V.N. [и др.]. Effect of Epitalon on biomarkers of aging, life span and spontaneous tumor incidence in female Swiss-derived SHR mice // *Biogerontology*. – 2003. – Т. 4. – № 4. – С. 193-202.

63. Anisimov V.N. [и др.]. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2006. – Т. 1757. – № 5-6. – С. 573-589.

64. Anisimov V.N. Premature ageing prevention: limitations and perspectives of pharmacological interventions / V.N. Anisimov // *Current Drug Targets*. – 2006. – Т. 7. – № 11. – С. 1485-1503.

65. Anisimov V.N. [и др.]. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on lifespan of rodents // *Aging (Albany NY)*. – 2011. – Т. 3. – № 11. – С. 1110-1119.

66. Anisimov V.N. [и др.]. Rodent models for the preclinical evaluation of drugs suitable for pharmacological intervention in aging // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2012. – Т. 7. – № 1. – С. 85-95.

67. Anisimov V.N. [и др.]. Polyphenolic drug composition based on benzenepolycarboxylic acids (BP-C3) increases life span and inhibits spontaneous tumorigenesis in female SHR mice // *Aging*. – 2016. – Т. 8. – № 9. – С. 1866-1875.
68. Anisimov V.N. [и др.]. Results and prospects of development of new polyphenolic drugs for cancer patients // *Oncotarget*. – 2017. – Т. 8. – № 59. – С. 100951-100956.
69. Anisimov V.N. Methods of evaluating the effect of of pharmacological drugs on aging and life span in mice / V.N. Anisimov, I.G. Popovich, M.A. Zabezhinski // In: *Biological Aging: Methods and Protocols*. Ed. by T.O. Tollefsbol (Methods in Molecular Biology; vol. 371). – Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007. – С. 227-236.
70. Anisimov V.N., Methods of testing pharmacological drugs effects on aging and life span in mice / V.N. Anisimov, I.G. Popovich, M.A. Zabezhinski // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). – 2013. – Т. 1048. – С. 145-160.
71. Aparicio-Domingo P. [и др.]. Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2015. – Т. 212. – № 11. – С. 1783-1791.
72. Arora R. [и др.]. Radioprotection by plant products: present status and future prospects // *Phytotherapy research: PTR*. 2005. № 1 (19). С. 1–22.
73. Assimopoulou A.N., Sinakos Z., Papageorgiou V.P. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents // *Phytotherapy research: PTR*. – 2005. – Т. 19. – Radioprotection by plant products. – № 1. – С. 1-22.
74. Aviles A. [и др.]. Interferon and low doses of methotrexate versus interferon and retinoids in the treatment of refractory/relapsed cutaneous T-cell lymphoma // *Hematology* (Amsterdam, Netherlands). – 2015. – Т. 20. – № 9. – С. 538-542.
75. Ayissi V.B. Epigenetic effects of natural polyphenols: a focus on SIRT1-mediated mechanisms / V.B. Ayissi, A. Ebrahimi, H. Schluesenner // *Molecular Nutrition & Food Research*. – 2014. – Т. 58. – № 1. – С. 22-32.
76. Badun G.A. [и др.] A new technique for tritium labeling of humic substances // *Radiochimica Acta*. – 2010. – Т. 98. – № 3. – С. 161–166.

77. Badun G.A. Increase in the specific radioactivity of tritium-labeled compounds obtained by tritium thermal activation method / G.A. Badun, M.G. Chernysheva, A.L. Ksenofontov // *Radiochimica Acta*. – 2012. – Т. 100. – № 6. – С. 401–408.
78. Bairati I. [и др.]. A randomized trial of antioxidant vitamins to prevent second primary cancers in head and neck cancer patients // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 2005. – Т. 97. – № 7. – С. 481-488.
79. Bairati I. [и др.]. Randomized trial of antioxidant vitamins to prevent acute adverse effects of radiation therapy in head and neck cancer patients // *Journal of Clinical Oncology*. – 2005. – Т. 23. – № 24. – С. 5805-5813.
80. Barapatre A. [и др.]. In vitro antioxidant and antidiabetic activities of biomodified lignin from *Acacia nilotica* wood // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2015. – Т. 75. – С. 81-89.
81. Barapatre A. [и др.]. In vitro evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of lignin fractions extracted from *Acacia nilotica* // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – Т. 86. – С. 443-453.
82. Barcelos G.R. [и др.]. Evaluation of antigenotoxic effects of plant flavonoids quercetin and rutin on HepG2 cells // *Phytotherapy research: PTR*. – 2011. – Т. 25. – № 9. – С. 1381-1388.
83. Barker N. Identifying the stem cell of the intestinal crypt: strategies and pitfalls / N. Barker, A. van Oudenaarden, H. Clevers // *Cell Stem Cell*. – 2012. – Т. 11. – № 4. – С. 452-460.
84. Barrajon-Catalan E. [и др.]. Molecular promiscuity of plant polyphenols in the management of age-related diseases: far beyond their antioxidant properties // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2014. – Т. 824. – С. 141-159.
85. Belicová A. [и др.]. Anti-u.v. activity of lignin biopolymers on *Euglena gracilis* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2000. – Т. 16. – № 1. – С. 91-93.

86. Bentzen S.M. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology / S.M. Bentzen // *Nature Reviews. Cancer.* – 2006. – Т. 6. – № 9. – С. 702-713.
87. Berk L. [и др.]. A randomized phase II trial of high dose melatonin and radiation therapy for RPA class 2 patients with brain metastases (RTOG 0119) // *International journal of radiation oncology, biology, physics.* – 2007. – Т. 68. – № 3. – С. 852-857.
88. Berkey F.J. Managing the adverse effects of radiation therapy / F.J. Berkey // *American Family Physician.* – 2010. – Т. 82. – № 4. – С. 381-388.
89. Bigley A.B. [и др.]. Can exercise-related improvements in immunity influence cancer prevention and prognosis in the elderly? // *Maturitas.* – 2013. – Т. 76. – № 1. – С. 51-56.
90. Bignon E. [и др.]. SR146131: a new potent, orally active, and selective nonpeptide cholecystinin subtype 1 receptor agonist. I. In vitro studies // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 1999. – Т. 289. – № 2. – С. 742-751.
91. Bjelakovic G. [и др.]. Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention: Systematic Review and Meta-analysis // *JAMA.* – 2007. – Т. 297. – № 8. – С. 842-857.
92. Blackburn M.R. [и др.]. Adenosine receptors and inflammation // *Handbook of Experimental Pharmacology.* – 2009. – № 193. – С. 215-269.
93. Blagosklonny M.V. Validation of anti-aging drugs by treating age-related diseases / M.V. Blagosklonny // *Aging.* – 2009. – Т. 1. – № 3. – С. 281-288.
94. Blagosklonny M.V. Selective anti-cancer agents as anti-aging drugs / M.V. Blagosklonny // *Cancer Biology & Therapy.* – 2013. – Т. 14. – № 12. – С. 1092-1097.
95. Blagosklonny M.V. Koschei the immortal and anti-aging drugs / M.V. Blagosklonny // *Cell Death & Disease.* – 2014. – Т. 5. – С. e1552.
96. Blagosklonny M.V. Common drugs and treatments for cancer and age-related diseases: revitalizing answers to NCI's provocative questions / M.V. Blagosklonny // *Oncotarget.* – 2013. – Т. 3. – № 12. – С. 1711-1724.

97. Boddy A.V. Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines / A.V. Boddy, S.M. Yule // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2000. – Т. 38. – № 4. – С. 291-304.
98. Bodine D.M. Effects of hematopoietic growth factors on the survival of primitive stem cells in liquid suspension culture / D.M. Bodine, P.S. Crosier, S.C. Clark // *Blood*. – 1991. – Т. 78. – С. 914-920.
99. Booth C. [и др.]. Acute gastrointestinal syndrome in high-dose irradiated mice // *Health Physics*. – 2012. – Т. 103. – № 4. – С. 383-399.
100. Borek C. Antioxidants and Radiation Therapy / C. Borek // *The Journal of Nutrition*. – 2004. – Т. 134. – № 11. – С. 3207S-3209S.
101. Bowes J. [и др.]. Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2012. – Т. 11. – № 12. – С. 909-922.
102. Braun M.S. Balancing the efficacy and toxicity of chemotherapy in colorectal cancer / M.S. Braun, M.T. Seymour // *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. – 2011. – Т. 3. – № 1. – С. 43-52.
103. Bray F.N. [и др.]. Acute and chronic cutaneous reactions to ionizing radiation therapy // *Dermatology and Therapy*. – 2016. – Т. 6. – № 2. – С. 185-206.
104. Brown G.B. 3H-batrachotoxinin-A benzoate binding to voltage-sensitive sodium channels: inhibition by the channel blockers tetrodotoxin and saxitoxin / G.B. Brown // *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. – 1986. – Т. 6. – № 7. – С. 2064-2070.
105. Buchan K.W. [и др.]. Characterization of three non-peptide endothelin receptor ligands using human cloned ETA and ETB receptors // *British Journal of Pharmacology*. – 1994. – Т. 112. – № 4. – С. 1251-1257.
106. Byfield J.E. 5-Fluorouracil radiation sensitization – a brief review / J.E. Byfield // *Investigational New Drugs*. – 1989. – Т. 7. – № 1. – С. 111-116.
107. Вукон В.Н. [и др.]. Radioprotective and radiomitigative effects of BP-C2, a novel lignin-derived polyphenolic composition with ammonium molybdate, in two mouse strains exposed to total body irradiation // *International Journal of Radiation Biology*. – 2018. – Т. 94. – № 2. – С. 114-123.

108. Cai L. [и др.]. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role // *Toxicology*. – 1999. – Т. 132. – № 2-3. – С. 85-98.
109. Carocho M. The role of phenolic compounds in the fight against cancer--a review / M. Carocho, I. Ferreira // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2013. – Т. 13. – № 8. – С. 1236-1258.
110. Carvalho Melo-Cavalcante A.A. de [и др.]. Retinol palmitate and ascorbic acid: Role in oncological prevention and therapy // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2019. – Т. 109. – С. 1394-1405.
111. Cella M. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1 β reveals intrinsic functional plasticity / M. Cella, K. Otero, M. Colonna // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Т. 107. – № 24. – С. 10961-10966.
112. Cesura A.M. [и др.]. Characterization of the binding of [3H]Ro 41-1049 to the active site of human monoamine oxidase-A // *Molecular Pharmacology*. – 1990. – Т. 37. – № 3. – С. 358-366.
113. Chacko S.M. [и др.]. Beneficial effects of green tea: A literature review // *Chinese Medicine*. – 2010. – Т. 5. – № 1. – С. 13.
114. Chakraborty M. Cardioprotective effect of curcumin and piperine combination against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity / M. Chakraborty, A. Bhattacharjee, J.V. Kamath // *Indian Journal of Pharmacology*. – 2017. – Т. 49. – № 1. – С. 65-70.
115. Chang H.-P. The protective role of carotenoids and polyphenols in patients with head and neck cancer / H.-P. Chang, L.-Y. Sheen, Y.-P. Lei // *Journal of the Chinese Medical Association*. – 2015. – Т. 78. – № 2. – С. 89-95.
116. Chen J.J. Targeting the bradykinin B1 receptor to reduce pain / J.J. Chen, E.J. Johnson // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. – 2007. – Т. 11. – № 1. – С. 21-35.
117. Chrystal K. Chemotherapy of small cell lung cancer: state of the art / K. Chrystal, K. Cheong, P. Harper // *Current Opinion in Oncology*. – 2004. – Т. 16. – № 2. – С. 136-140.

118. Clark A.F. [и др.]. Inhibition of dexamethasone-induced cytoskeletal changes in cultured human trabecular meshwork cells by tetrahydrocortisol // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 1996. – Т. 37. – № 5. – С. 805-813.
119. Coccia A. [и др.]. Extra-virgin olive oil phenols block cell cycle progression and modulate chemotherapeutic toxicity in bladder cancer cells // *Oncology Reports*. – 2016. – Т. 36. – № 6. – С. 3095-3104.
120. Cohen A. Experimental radiotherapy of abdominal cancer. II. Effect of a flavonone (rutin) on radiation reactions / A. Cohen, L. Cohen // *The British Journal of Radiology*. – 1952. – Т. 25. – № 299. – С. 601-605.
121. Coia L.R. Introduction to clinical radiation oncology / L.R. Coia, D.J. Moylan. – Madison, WI: Medical Physics Publishing, 1998. – 605 с.
122. Comalada M. [и др.]. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship // *Biochemical Pharmacology*. – 2006. – Т. 72. – № 8. – С. 1010-1021.
123. Conklin K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness / K.A. Conklin // *Integrative Cancer Therapies*. – 2004. – Т. 3. – № 4. – С. 294-300.
124. Conti B. [и др.]. Transgenic mice with a reduced core body temperature have an increased life span // *Science (New York, N.Y.)*. – 2006. – Т. 314. – № 5800. – С. 825-828.
125. Coronado-Cerda E.E. [и др.]. In vivo chemoprotective activity of bovine dialyzable leukocyte extract in mouse bone marrow cells against damage induced by 5-fluorouracil // *Journal of Immunology Research*. – 2016. – Т. 2016. – С. 6942321.
126. Costa P.L. da [и др.]. The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities // *Cancer Letters*. – 2014. – Т. 345. – № 1. – С. 27-38.
127. Dainiak N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation / N. Dainiak // *Experimental Hematology*. – 2002. – Т. 30. – № 6. – С. 513-528.
128. Das L. Long term effect of curcumin in restoration of tumour suppressor p53 and phase-II antioxidant enzymes via activation of Nrf2 signalling and modulation of

inflammation in prevention of cancer / L. Das, M. Vinayak // *PloS One*. – 2015. – Т. 10. – № 4. – С. e0124000.

129. Davis T.A. [и др.]. Subcutaneous administration of genistein prior to lethal irradiation supports multilineage, hematopoietic progenitor cell recovery and survival // *International Journal of Radiation Biology*. – 2007. – Т. 83. – № 3. – С. 141-151.

130. Day R.M. [и др.]. Enhanced hematopoietic protection from radiation by the combination of genistein and captopril // *International Immunopharmacology*. – 2013. – Т. 15. – № 2. – С. 348-356.

131. Deng W. [и др.]. Mitigation of the hematopoietic and gastrointestinal acute radiation syndrome by octadecenyl thiophosphate, a small molecule mimic of lysophosphatidic acid // *Radiation research*. – 2015. – Т. 183. – № 4. – С. 465-475.

132. Deng Y. [и др.]. The extract from *Punica granatum* (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2017. – Т. 93. – С. 976-984.

133. Dimopoulos M.A. [и др.]. Pulsed cyclophosphamide, thalidomide and dexamethasone: an oral regimen for previously treated patients with multiple myeloma // *The Hematology Journal: The Official Journal of the European Haematology Association*. – 2004. – Т. 5. – № 2. – С. 112-117.

134. Dolara P. Antioxidant vitamins and mineral supplementation, life span expansion and cancer incidence: a critical commentary / P. Dolara, E. Bigagli, A. Collins // *European Journal of Nutrition*. – 2012. – Т. 51. – № 7. – С. 769-781.

135. Dörje F. [и др.]. Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1991. – Т. 256. – № 2. – С. 727-733.

136. Dracham C.B. Radiation induced secondary malignancies: a review article / C.B. Dracham, A. Shankar, R. Madan // *Radiation Oncology Journal*. – 2018. – Т. 36. – № 2. – С. 85-94.

137. Ellman G.L. [и др.]. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // *Biochemical Pharmacology*. – 1961. – Т. 7. – С. 88-95.

138. El-Sheikh A.A. Inhibition of NF- κ B/TNF- α pathway may be involved in the protective effect of resveratrol against cyclophosphamide-induced multi-organ toxicity / A.A. El-Sheikh, M.A. Morsy, A.M. Okasha // Immunopharmacology and Immunotoxicology. – 2017. – Т. 39. – № 4. – С. 180-187.

139. Espinoza-Acosta J.L. [и др.]. Antioxidant, antimicrobial, and antimutagenic properties of technical lignins and their applications // BioResources. – 2016. – Т. 11. – № 2. – С. 5452-5481.

140. Fang M.Z. [и др.]. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy // Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research. – 2005. – Т. 11. – № 19 Pt 1. – С. 7033-7041.

141. Fantini M. [и др.]. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Т. 16. – № 5. – С. 9236-9282.

142. Fares F. [и др.]. An innovative complex of benzene-poly-carboxylic acid and molybdenum, for prevention and treatment of radiation dermatitis // Medicinal Chemistry. – 2018. – Т. 5. – № 10. – С. 447-451.

143. Fedoros E.I. [и др.]. Novel water-soluble lignin derivative BP-Cx-1: identification of components and screening of potential targets in silico and in vitro // Oncotarget. – 2018. – Т. 9. – № 26. – С. 18578-18593.

144. Ferreira P.R. [и др.]. Protective effect of alpha-tocopherol in head and neck cancer radiation-induced mucositis: a double-blind randomized trial // Head & Neck. – 2004. – Т. 26. – № 4. – С. 313-321.

145. Frangville C. [и др.]. Fabrication of environmentally biodegradable lignin nanoparticles // Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry. – 2012. – Т. 13. – № 18. – С. 4235-4243.

146. Fulop T. [и др.]. On the immunological theory of aging // Interdisciplinary Topics in Gerontology. – 2014. – Т. 39. – С. 163-176.

147. Gajowik A. Lycopene - antioxidant with radioprotective and anticancer properties. A review / A. Gajowik, M.M. Dobrzyńska // *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*. – 2014. – T. 65. – № 4. – С. 263-271.
148. Ganesh T. Prostanoid receptor EP2 as a therapeutic target / T. Ganesh // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – T. 57. – № 11. – С. 4454-4465.
149. García-Lafuente A. [и др.]. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease // *Inflammation Research*. – 2009. – Т. 58. – № 9. – С. 537-552.
150. Garofalo M.C. [и др.]. A pilot study in rhesus macaques to assess the treatment efficacy of a small molecular weight catalytic metalloporphyrin antioxidant (AEOL 10150) in mitigating radiation-induced lung damage // *Health Physics*. – 2014. – Т. 106. – № 1. – С. 73-83.
151. Gerhauser C. Cancer chemoprevention and nutriepigenetics: state of the art and future challenges / C. Gerhauser // *Topics in Current Chemistry*. – 2013. – Т. 329. – С. 73-132.
152. Ghosh S.P. [и др.]. Gamma-tocotrienol, a tocol antioxidant as a potent radioprotector // *International Journal of Radiation Biology*. – 2009. – Т. 85. – № 7. – С. 598-606.
153. Glaser K. [и др.]. Etodolac selectively inhibits human prostaglandin G/H synthase 2 (PGHS-2) versus human PGHS-1 // *European Journal of Pharmacology*. – 1995. – Т. 281. – № 1. – С. 107-111.
154. González-Vallinas M. [и др.]. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives // *Nutrition Reviews*. – 2013. – Т. 71. – № 9. – С. 585-599.
155. Gopalakrishnan M. [и др.]. Stable expression, pharmacologic properties and regulation of the human neuronal nicotinic acetylcholine alpha 4 beta 2 receptor // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1996. – Т. 276. – № 1. – С. 289-297.

156. Gorrini C. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy / C. Gorrini, I.S. Harris, T.W. Mak // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2013. – Т. 12. – № 12. – С. 931-947.
157. Gorzynik-Debicka M. [и др.]. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Т. 19. – № 3. – С. 686.
158. Gould R.J. [3H]nitrendipine-labeled calcium channels discriminate inorganic calcium agonists and antagonists / R.J. Gould, K.M. Murphy, S.H. Snyder // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1982. – Т. 79. – № 11. – С. 3656-3660.
159. Grandy D.K. [и др.]. Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1989. – Т. 86. – № 24. – С. 9762-9766.
160. Greenberger J. Toxic effects on the hematopoietic microenvironment / J. Greenberger // *Exp Hematol*. – 1991. – Т. 19. – С. 1101.
161. Grivennikov S.I. Immunity, inflammation, and cancer / S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin // *Cell*. – 2010. – Т. 140. – № 6. – С. 883-899.
162. Grzybowski A. Albert Szent-Györgyi (1893-1986): the scientist who discovered vitamin C. / A. Grzybowski, K. Pietrzak // *Clinics in dermatology*. – 2013. – Т. 31. – № 3. – С. 327-331.
163. Gu J. [и др.]. Effect of amifostine in head and neck cancer patients treated with radiotherapy: a systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials // *PloS One*. – 2014. – Т. 9. – № 5. – С. e95968.
164. Gupte A. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment / A. Gupte, R.J. Mumper // *Cancer Treatment Reviews*. – 2009. – Т. 35. – № 1. – С. 32-46.
165. Harvie M. Nutritional supplements and cancer: potential benefits and proven harms // *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*. – 2014. – Nutritional supplements and cancer. – С. e478-486.

166. Hasegawa Y. [и др.]. Lignosulfonic acid-induced inhibition of intestinal glucose absorption // *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. – 2015. – Т. 61. – № 6. – С. 449-454.
167. Hazenberg M.D. Human innate lymphoid cells / M.D. Hazenberg, H. Spits // *Blood*. – 2014. – Т. 124. – № 5. – С. 700-709.
168. Hejazi J. [и др.]. Effect of curcumin supplementation during radiotherapy on oxidative status of patients with prostate cancer: a double blinded, randomized, placebo-controlled study // *Nutrition and Cancer*. – 2016. – Т. 68. – № 1. – С. 77-85.
169. Hofmann J. [и др.]. Enhancement of the antiproliferative activity of cis-diamminedichloroplatinum(II) by quercetin *International Journal of Cancer*. – 1990. – Т. 45. – № 3. – С. 536-539.
170. Hosseinimehr S.J. Trends in the development of radioprotective agents / S.J. Hosseinimehr // *Drug Discovery Today*. – 2007. – Т. 12. – № 19-20. – С. 794-805.
171. Hosseinimehr S.J. [и др.]. 5,7-Dihydroxychromone-2-carboxylic acid and its transition-metal (Mn and Zn) chelates as non-thiol radioprotective agents // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2008. – Т. 43. – № 3. – С. 557-561.
172. Hu J.-M. [и др.]. Five new compounds from *Dendrobium longicornu* // *Planta Medica*. – 2008. – Т. 74. – № 5. – С. 535-539.
173. Hua G. [и др.]. Crypt base columnar stem cells in small intestines of mice are radioresistant // *Gastroenterology*. – 2012. – Т. 143. – № 5. – С. 1266-1276.
174. Huang X.-P. [и др.]. Identification of human Ether-à-go-go related gene modulators by three screening platforms in an academic drug-discovery setting // *Assay and Drug Development Technologies*. – 2010. – Т. 8. – № 6. – С. 727-742.
175. Hübner S. [и др.]. The glucocorticoid receptor in inflammatory processes: transrepression is not enough // *Biological Chemistry*. – 2015. – Т. 396. – № 11. – С. 1223-1231.
176. Hughes T. [и др.]. Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue // *Immunity*. – 2010. – Т. 32. – № 6. – С. 803-814.

177. Hurst R. [и др.]. Selenium and prostate cancer: systematic review and meta-analysis // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2012. – Т. 96. – № 1. – С. 111-122.
178. Ibrahim T. [и др.]. BP-C2 improves functional status, quality of life and corrects biochemical imbalances as adjuvant therapy to FOLFIRINOX treatment: A case of advanced inoperable pancreatic cancer // *Journal of Clinical Case Reports*. – 2015. – Т. 05. – № 04. – С. 514.
179. Jagetia G.C. Curcumin stimulates the antioxidant mechanisms in mouse skin exposed to fractionated γ -irradiation / G.C. Jagetia, G.K. Rajanikant // *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. – 2015. – Т. 4. – № 1. – С. 25-41.
180. Jaworska K. [и др.]. A low selenium level is associated with lung and laryngeal cancers // *PloS One*. – 2013. – Т. 8. – № 3. – С. e59051.
181. Jeong B.K. [и др.]. Effect of alpha-lipoic acid on radiation-induced small intestine injury in mice // *Oncotarget*. – 2016. – Т. 7. – № 12. – С. 15105-15117.
182. Joseph S.S. [и др.]. Binding of (-)-[3H]-CGP12177 at two sites in recombinant human beta 1-adrenoceptors and interaction with beta-blockers // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 2004. – Т. 369. – № 5. – С. 525-532.
183. Jung M. [и др.]. Iron as a central player and promising target in cancer progression // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Т. 20. – № 2. – С. 273.
184. Kapinova A. [и др.]. Are plant-based functional foods better choice against cancer than single phytochemicals? A critical review of current breast cancer research // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2017. – Т. 96. – С. 1465-1477.
185. Katiyar S.K. [и др.]. Protection against induction of mouse skin papillomas with low and high risk of conversion to malignancy by green tea polyphenols // *Carcinogenesis*. – 1997. – Т. 18. – № 3. – С. 497-502.
186. Kato S. [и др.]. Saireito (TJ-114), a Japanese traditional herbal medicine, reduces 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice by inhibiting cytokine-mediated apoptosis in intestinal crypt cells // *PloS One*. – 2015. – Т. 10. – № 1. – С. e0116213.

187. Khan H.Y. [и др.]. Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation: a mechanism for cancer chemopreventive action // *Molecular Nutrition & Food Research*. – 2014. – Т. 58. – № 3. – С. 437-446.

188. Kim M.-S. [и др.]. Fructus mume ethanol extract prevents inflammation and normalizes the septohippocampal cholinergic system in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion // *Journal of Medicinal Food*. – 2016. – Т. 19. – № 2. – С. 196-204.

189. Kiraz Y. [и др.]. Apoptotic effects of non-edible parts of *Punica granatum* on human multiple myeloma cells // *Tumor Biology*. – 2016. – Т. 37. – № 2. – С. 1803-1815.

190. Kontou N. [и др.]. The mediterranean diet in cancer prevention: a review // *Journal of Medicinal Food*. – 2011. – Т. 14. – № 10. – С. 1065-1078.

191. Koontz B.F. Tumour and normal tissue radiobiology in mouse models: how close are mice to mini-humans? / B.F. Koontz, F. Verhaegen, D. De Ruyscher // *The British Journal of Radiology*. – 2016. – Т. 90. – № 1069. – С. 20160441.

192. Kooshyar M.M. [и др.]. A randomized placebo- controlled double blind clinical trial of quercetin in the prevention and treatment of chemotherapy-induced oral mucositis // *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*. – 2017. – Т. 11. – № 3. – С. ZC46-ZC50.

193. Košíková B. [и др.]. Reduction of carcinogenesis by bio-based lignin derivatives // *Biomass and Bioenergy*. – 2002. – Т. 23. – № 2. – С. 153-159.

194. Kostyuk V.A. [и др.]. Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2004. – Т. 428. – № 2. – С. 204-208.

195. Krivokrysenko V.I. [и др.]. Identification of granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6 as candidate biomarkers of CBLB502 efficacy as a medical radiation countermeasure // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2012. – Т. 343. – № 2. – С. 497-508.

196. Kubatka P. [и др.]. Fruit peel polyphenols demonstrate substantial anti-tumour effects in the model of breast cancer // *European Journal of Nutrition*. – 2016. – Т. 55. – № 3. – С. 955-965.
197. Kuhlmann M.K. [и др.]. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin // *Archives of Toxicology*. – 1998. – Т. 72. – № 8. – С. 536-540.
198. Kuntić V.S. [и др.]. Radioprotectors - the evergreen topic // *Chemistry & Biodiversity*. – 2013. – Т. 10. – № 10. – С. 1791-1803.
199. Lábaj J. [и др.]. Induction of DNA-lesions in freshly isolated rat hepatocytes by different genotoxins and their reduction by lignin given either as a dietary component or in in vitro conditions // *Nutrition and Cancer*. – 2007. – Т. 57. – № 2. – С. 209-215.
200. Lábaj J. Reduction of genotoxic effects of the carcinogen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine by dietary lignin in mammalian cells cultured in vitro / J. Lábaj, D. Slamenová, B. Kosikova // *Nutrition and Cancer*. – 2003. – Т. 47. – № 1. – С. 95-103.
201. Ladas E.J. [и др.]. Antioxidants and cancer therapy: a systematic review // *Journal of Clinical Oncology*. – 2004. – Т. 22. – № 3. – С. 517-528.
202. Lamson D.W. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies / D.W. Lamson, M.S. Brignall // *Alternative Medicine Review* – 1999. – Т. 4. – № 5. – С. 304-329.
203. Langin D. [и др.]. [³H]RX821002: a new tool for the identification of alpha 2A-adrenoceptors // *European Journal of Pharmacology*. – 1989. – Т. 167. – № 1. – С. 95-104.
204. Larsen S. [и др.]. BP-C1 in the treatment of patients with stage IV breast cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter study and an additional open-label treatment phase // *Breast Cancer* (Dove Medical Press). – 2014. – Т. 6. – С. 179-189.
205. Lawenda B.D. [и др.]. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2008. – Т. 100. – № 11. – С. 773-783.

206. Lee H.J. [и др.]. Modification of gamma-radiation response in mice by green tea polyphenols // *Phytotherapy research: PTR.* – 2008. – Т. 22. – № 10. – С. 1380-1383.
207. Lee W.J. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols / W.J. Lee, B.T. Zhu // *Carcinogenesis.* – 2006. – Т. 27. – № 2. – С. 269-277.
208. Lefaix J.L. [и др.]. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using Cu/Zn-SOD and Mn-SOD: an experimental study // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics.* – 1996. – Т. 35. – № 2. – С. 305-312.
209. Leitão R.F. [и др.]. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* – 2007. – Т. 59. – № 5. – С. 603-612.
210. Lener M.R. [и др.]. Can selenium levels act as a marker of colorectal cancer risk? // *BMC cancer.* – 2013. – Т. 13. – С. 214.
211. Leurs R. [и др.]. Pharmacological characterization of the human histamine H2 receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells // *British Journal of Pharmacology.* – 1994. – Т. 112. – № 3. – С. 847-854.
212. Levin M.C. [и др.]. The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta 1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2002. – Т. 277. – № 34. – С. 30429-30435.
213. Li M. [и др.]. ³¹P NMR characterization of tricetin and its structurally similar flavonoids // *ChemistrySelect.* – 2017. – Т. 2. – № 12. – С. 3557-3561.
214. Link A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics / A. Link, F. Balaguer, A. Goel // *Biochemical Pharmacology.* – 2010. – Т. 80. – № 12. – С. 1771-1792.
215. Liska D.J. The detoxification enzyme systems / D.J. Liska // *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic.* – 1998. – Т. 3. – № 3. – С. 187-198.

216. Lissoni P. [и др.]. Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone // *Oncology*. – 1996. – Т. 53. – № 1. – С. 43-46.

217. Lissoni P. [и др.]. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial // *Journal of Pineal Research*. – 2003. – Т. 35. – № 1. – С. 12-15.

218. Luo H. [и др.]. Resveratrol enhances ionizing radiation-induced premature senescence in lung cancer cells // *International Journal of Oncology*. – 2013. – Т. 43. – № 6 – С. 1999–2006.

219. Luthin D.R. [и др.]. Characterization of two affinity states of adenosine A2a receptors with a new radioligand, 2-[2-(4-amino-3-[125I]iodophenyl)ethylamino]adenosine. // *International Journal of Oncology*. – 2013. – Т. 43. – № 6. – С. 1999-2006.

220. Ma Z. [и др.]. [Anti-radiation effect of resveratrol] // *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. – 2013. – Т. 38. – С. 597-601.

221. Majid S. [и др.]. BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer // *Carcinogenesis*. – 2009. – Т. 30. – № 4. – С. 662-670.

222. Malhotra A. Study to evaluate molecular mechanics behind synergistic chemo-preventive effects of curcumin and resveratrol during lung carcinogenesis / A. Malhotra, P. Nair, D.K. Dhawan // *PLoS ONE*. – 2014. – Т. 9. – № 4. – e93820.

223. Martin M. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? / M. Martin, J. Lefaix, S. Delanian // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2000. – Т. 47. – № 2. – С. 277-290.

224. Mathew S. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions / S. Mathew, T.E. Abraham, Z.A. Zakaria // *Journal of Food Science and Technology*. – 2015. – Т. 52. – № 9. – С. 5790.

225. Matsunaga T. [и др.]. Toxicity against gastric cancer cells by combined treatment with 5-fluorouracil and mitomycin c: implication in oxidative stress // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2010. – Т. 66. – № 3. – С. 517-526.

226. Maurice D.H. [и др.]. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2014. – Т. 13. – № 4. – С. 290-314.

227. Mcculloch E.A. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice / E.A. Mcculloch, J.E. Till // *Radiation Research*. – 1960. – Т. 13. – С. 115-125.

228. Mell L.K. [и др.]. Effect of amifostine on response rates in locally advanced non-small-cell lung cancer patients treated on randomized controlled trials: a meta-analysis // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2007. – Т. 68. – № 1. – С. 111-118.

229. Metcalfe C. [и др.]. Lgr5+ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration // *Cell Stem Cell*. – 2014. – Т. 14. – № 2. – С. 149-159.

230. Miccadei S. [и др.]. Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells // *Nutrition and Cancer*. – 2008. – Т. 60. – № 2. – С. 276-283.

231. Mikulášová M. Modulation of mutagenicity of various mutagens by lignin derivatives / M. Mikulášová, B. Kosíková // *Mutation Research*. – 2003. – Т. 535. – № 2. – С. 171-180.

232. Mileo A.M. [и др.]. Artichoke polyphenols induce apoptosis and decrease the invasive potential of the human breast cancer cell line MDA-MB231 // *Journal of Cellular Physiology*. – 2012. – Т. 227. – № 9. – С. 3301-3309.

233. Mileo A.M. [и др.]. Long term exposure to polyphenols of artichoke (*Cynara scolymus* L.) exerts induction of senescence driven growth arrest in the MDA-MB231 human breast cancer cell line // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2015. – Т. 2015. – С. 363827.

234. Mileo A.M. Polyphenols as modulator of oxidative stress in cancer disease: new therapeutic strategies / A.M. Mileo, S. Miccadei // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Т. 2016. – С. 6475624.

235. Mills E. [и др.]. Melatonin in the treatment of cancer: a systematic review of randomized controlled trials and meta-analysis // *Journal of Pineal Research*. – 2005. – Т. 39. – № 4. – С. 360-366.

236. Misirlioglu C.H. [и др.]. Effect of concomitant use of pentoxifylline and alpha-tocopherol with radiotherapy on the clinical outcome of patients with stage IIIB non-small cell lung cancer: a randomized prospective clinical trial // *Medical Oncology* (Northwood, London, England). – 2006. – Т. 23. – № 2. – С. 185-189.

237. Miura N. [и др.]. Protective effect of bismuth nitrate against injury to the bone marrow by gamma-irradiation in mice: possible involvement of induction of metallothionein synthesis // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1998. – Т. 286. – № 3. – С. 1427-1430.

238. Morton L.M. [и др.]. The rising incidence of second cancers: patterns of occurrence and identification of risk factors for children and adults // *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting. – 2014. – С. e57-67.

239. Mulheron J.G. [и др.]. Human 5-HT_{1A} receptor expressed in insect cells activates endogenous G(o)-like G protein(s) // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Т. 269. – № 17. – С. 12954-12962.

240. Munro S. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids / S. Munro, K.L. Thomas, M. Abu-Shaar // *Nature*. – 1993. – Т. 365. – № 6441. – С. 61-65.

241. Murakami A. Dose-dependent functionality and toxicity of green tea polyphenols in experimental rodents / A. Murakami // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2014. – Т. 557. – С. 3-10.

242. Murakami H. Antitumor mechanisms of lignins in foods : II. Antitumor potency of lignin preparations produced by pulping procedures of woods / H. Murakami, C. Ochiai, H. Omura // *Science bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*. – 1976. – Т. 4. – № 28. – С. 215-221.

243. Murata M. [и др.]. Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis // *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. – 2012. – Т. 2012. – С. 623019.

244. Mut-Salud N. [и др.]. Antioxidant intake and antitumor therapy: Toward nutritional recommendations for optimal results // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Т. 2016. – С. 6719534.

245. Nadal-Serrano M. [и др.]. Genistein modulates oxidative stress in breast cancer cell lines according to ER α /ER β ratio: effects on mitochondrial functionality, sirtuins, uncoupling protein 2 and antioxidant enzymes // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2013. – Т. 45. – № 9. – С. 2045-2051.

246. Nair K L. [и др.]. Biological evaluation of 5-fluorouracil nanoparticles for cancer chemotherapy and its dependence on the carrier, PLGA // *International Journal of Nanomedicine*. – 2011. – Т. 6. – С. 1685-1697.

247. Nair S.C. [и др.]. Modulatory effects of *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in mice // *Journal of Ethnopharmacology*. – 1991. – Т. 31. – № 1. – С. 75-83.

248. Nandakumar V. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells / V. Nandakumar, M. Vaid, S.K. Katiyar // *Carcinogenesis*. – 2011. – Т. 32. – № 4. – С. 537-544.

249. National Research Council (US). Continuing Efforts to More Efficiently Use Laboratory Animals / National Research Council (US) // *Science, Medicine, and Animals*. – Washington (DC): National Academies Press (US), 2004. – С. 37-39.

250. National Research Council (US). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals : The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health / National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – 8th. – Washington (DC): National Academies Press (US), 2011. – 246 с.

251. Navolotskii D.V. [и др.]. Pharmacokinetics and tissue distribution of novel platinum containing anticancer agent BP-C1 studied in rabbits using sector field

inductively coupled plasma mass spectrometry // *Drug Testing and Analysis*. – 2015. – Т. 7. – № 9. – С. 737-744.

252. Ngoc P.L. [и др.]. Cytokines, allergy, and asthma // *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. – 2005. – Т. 5. – № 2. – С. 161-166.

253. Nguyen N.U., Polyphenols reported to shift APAP-induced changes in MAPK signaling and toxicity outcomes / N.U. Nguyen, B.D. Stamper // *Chemico-Biological Interactions*. – 2017. – Т. 277. – С. 129-136.

254. Norat T. [и др.]. Fruits and vegetables: updating the epidemiologic evidence for the WCRF/AICR lifestyle recommendations for cancer prevention // *Cancer Treatment and Research*. – 2014. – Т. 159. – С. 35-50.

255. Oenema T.A. [и др.]. Pro-inflammatory mechanisms of muscarinic receptor stimulation in airway smooth muscle // *Respiratory Research*. – 2010. – Т. 11. – С. 130.

256. Oyenihi A.B. Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anti-cancer success? / A.B. Oyenihi, C. Smith // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2019. – Т. 229. – С. 54-72.

257. Özyurt H. [и др.]. Quercetin protects radiation-induced DNA damage and apoptosis in kidney and bladder tissues of rats // *Free Radical Research*. – 2014. – Т. 48. – № 10. – С. 1247-1255.

258. Pacholczyk T. Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter / T. Pacholczyk, R.D. Blakely, S.G. Amara // *Nature*. – 1991. – Т. 350. – № 6316. – С. 350-354.

259. Paller C.J. Challenges of conducting clinical trials of natural products to combat cancer / C.J. Paller, S.R. Denmeade, M.A. Carducci // *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O*. – 2016. – Т. 14. – № 6. – С. 447-455.

260. Pan X. [и др.]. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: Relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – Т. 54. – № 16. – С. 5806-5813.

261. Panchenko A.V. [и др.]. Biomarkers of aging, life span and spontaneous carcinogenesis in the wild type and HER-2 transgenic FVB/N female mice // *Biogerontology*. – 2016. – Т. 17. – № 2. – С. 317-324.

262. Panchenko A.V. [и др.]. Effect of the polyphenol composition BP-C3 on haematological and intestinal indicators of 5-fluorouracil toxicity in mice // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2018. – Т. 15. – № 3. – С. 3124-3132.

263. Panchenko A.V. [и др.]. The effect of polyphenolic composition BP-C3 on the efficacy and hematological toxicity of cyclophosphamide in the chemotherapy of mice bearing soft tissue sarcomas induced by benzo[a]pyrene // *Integrative Cancer Therapies*. – 2019. – Т. 18. – С. 1534735419833778.

264. Papież M.A. The influence of curcumin and (-)-epicatechin on the genotoxicity and myelosuppression induced by etoposide in bone marrow cells of male rats / M.A. Papież // *Drug and Chemical Toxicology*. – 2013. – Т. 36. – № 1. – С. 93-101.

265. Park Y.W. [и др.]. Homogeneous proximity tyrosine kinase assays: scintillation proximity assay versus homogeneous time-resolved fluorescence // *Analytical Biochemistry*. – 1999. – Т. 269. – № 1. – С. 94-104.

266. Pathak A.K. [и др.]. Chemotherapy alone vs. chemotherapy plus high dose multiple antioxidants in patients with advanced non small cell lung cancer // *Journal of the American College of Nutrition*. – 2005. – Т. 24. – № 1. – С. 16-21.

267. Peralta E.G. [и др.]. Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors // *The EMBO journal*. – 1987. – Т. 6. – № 13. – С. 3923-3929.

268. Perlamutrov Y.N. Double-blind controlled randomised study of lactulose and lignin hydrolysed combination in complex therapy of atopic dermatitis / Y.N. Perlamutrov, K.B. Olhovskaya, S.A. Zakirova // *Microbial Ecology in Health and Disease*. – 2016. – Т. 27. – С. 30418.

269. Perminova I.V. [и др.] Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances // *Water Research*. – 1998. – Т. 32. – № 3. – С. 872-881.

270. Peter R.U. Diagnosis and treatment of cutaneous radiation injuries. / R.U. Peter // Radiation Treatment and Radiation Reactions in Dermatology. / ред. R.G. Panizzonand, M.H. Seegenschmiedt. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. – С. 185-188.

271. Plett P.A. [и др.]. Establishing a murine model of the hematopoietic syndrome of the acute radiation syndrome // Health Physics. – 2012. – Т. 103. – № 4. – С. 343-355.

272. Poon M.A. [и др.]. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma // Journal of Clinical Oncology. – 1989. – Т. 7. – № 10. – С. 1407-1418.

273. Popovich I.G. [и др.]. Effect of delta-sleep inducing peptide-containing preparation Deltaran on biomarkers of aging, life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice // Mechanisms of Ageing and Development. – 2003. – Т. 124. – № 6. – С. 721-731.

274. Pristupa Z.B. [и др.]. Pharmacological heterogeneity of the cloned and native human dopamine transporter: disassociation of [3H]WIN 35,428 and [3H]GBR 12,935 binding // Molecular Pharmacology. – 1994. – Т. 45. – № 1. – С. 125-135.

275. Priyadarsini R.V. [и др.]. The flavonoid quercetin modulates the hallmark capabilities of hamster buccal pouch tumors // Nutrition and Cancer. – 2011. – Т. 63. – № 2. – С. 218-226.

276. Qazi S.S. [и др.]. Antioxidant activity of the lignins derived from fluidized-bed fast pyrolysis // Molecules (Basel, Switzerland). – 2017. – Т. 22. – № 3. – С. 372.

277. Radhakrishnan S. [и др.]. Resveratrol potentiates grape seed extract induced human colon cancer cell apoptosis // Frontiers in Bioscience (Elite Edition). – 2011. – Т. 3. – С. 1509-1523.

278. Raghuraman A. [и др.]. Viral inhibition studies on sulfated lignin, a chemically modified biopolymer and a potential mimic of heparan sulfate // Biomacromolecules. – 2007. – Т. 8. – № 5. – С. 1759-1763.

279. Rahman I. Dietary polyphenols, deacetylases and chromatin remodeling in inflammation / I. Rahman, S. Chung // *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*. – 2010. – Т. 3. – № 4-6. – С. 220-230.
280. Rajendran R. [и др.]. Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription // *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. – 2011. – Т. 2011. – С. 368276.
281. Rao R. [и др.]. The combination of fludarabine, cyclophosphamide, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the treatment of patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia and low-grade Non-Hodgkin's lymphoma // *Clinical Lymphoma*. – 2005. – Т. 6. – № 1. – С. 26-30.
282. Ribeiro R.A. [и др.]. Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2016. – Т. 78. – № 5. – С. 881-893.
283. Richter A.P. [и др.]. An environmentally benign antimicrobial nanoparticle based on a silver-infused lignin core // *Nature Nanotechnology*. – 2015. – Т. 10. – № 9. – С. 817-823.
284. Rinaldi-Carmona M. [и др.]. Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1996. – Т. 278. – № 2. – С. 871-878.
285. Rivina L. Mouse models for radiation-induced cancers / L. Rivina, M.J. Davoren, R.H. Schiestl // *Mutagenesis*. – 2016. – Т. 31. – № 5. – С. 491-509.
286. Rosen E.M. New approaches to radiation protection / E.M. Rosen, R. Day, V.K. Singh // *Frontiers in Oncology*. – 2014. – Т. 4. – С. 381.
287. Ryan J.L. Ionizing radiation: the good, the bad, and the ugly / J.L. Ryan // *The Journal of investigative dermatology*. – 2012. – Т. 132. – № 3 0 2. – С. 985-993.
288. Sahu B.D. [и др.]. Naringin ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated mitochondrial dysfunction, apoptosis and inflammation in rats: possible mechanism of nephroprotection // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2014. – Т. 277. – № 1. – С. 8-20.

289. Sak K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents // / K. Sak // Chemotherapy Research and Practice. – 2012. – Т. 2012. – С. 282570.
290. Saluja B. [и др.]. Novel low molecular weight lignins as potential anti-emphysema agents: In vitro triple inhibitory activity against elastase, oxidation and inflammation // Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. – 2013. – Т. 26. – № 2. – С. 296-304.
291. Salvo N. [и др.]. Prophylaxis and management of acute radiation-induced skin reactions: a systematic review of the literature // Current Oncology. – 2010. – Т. 17. – № 4. – С. 94-112.
292. Santi D.V. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate / D.V. Santi, C.S. McHenry, H. Sommer // Biochemistry. – 1974. – Т. 13. – № 3. – С. 471-481.
293. Scambia G. [и др.]. Inhibitory effect of quercetin on primary ovarian and endometrial cancers and synergistic activity with cis-diamminedichloroplatinum (II) // Gynecologic Oncology. – 1992. – Т. 45. – № 1. – С. 13-19.
294. Schwinn D.A. [и др.]. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype // The Journal of Biological Chemistry. – 1990. – Т. 265. – № 14. – С. 8183-8189.
295. Sebastia N. [и др.]. Curcumin and trans-resveratrol exert cell cycle-dependent radioprotective or radiosensitizing effects as elucidated by the PCC and G2-assay // Mutation Research. – 2014. – Т. 766-767. – С. 49-55.
296. Senkus E. [и др.]. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology. – 2015. – Т. 26 Suppl 5. – С. v8-30.
297. Sevgi K. Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. / K. Sevgi, B. Tepe, C. Sarikurkcu // Food and chemical toxicology . – 2015. – Т. 77. – С. 12-21.
298. Shacter E. Chronic inflammation and cancer / E. Shacter, S.A. Weitzman // Oncology (Williston Park, N.Y.). – 2002. – Т. 16. – № 2. – С. 217-226, 229; discussion 230-232.

299. Shamsabadipour S. [и др.]. Triterpenes and steroids from *euphorbia denticulata* lam. with anti-herpes symplex virus activity // *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. – 2013. – Т. 12. – № 4. – С. 759-767.

300. Shankar S. Epigenetic modifications by dietary phytochemicals: implications for personalized nutrition / S. Shankar, D. Kumar, R.K. Srivastava // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2013. – Т. 138. – № 1. – С. 1-17.

301. Shipov V. Benzene Polycarboxylic Acid Compounds and Their Use as Drug: US9644074B2 United States / V. Shipov, E. Pigarev, E. Fedoros: заявитель и патентообладатель RDInnovationApS, Copenhagen (DK) – № PCT/DK2013/050092; заявл. 02.04.2013; опубл. 21.01.2016 № US2016/OO17104A1.

302. Shirakami Y. Cancer chemoprevention with green tea catechins: from bench to bed / Y. Shirakami, M. Shimizu, H. Moriwaki // *Current Drug Targets*. – 2012. – Т. 13. – № 14. – С. 1842-1857.

303. Shu L. [и др.]. Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis // *Cancer Metastasis Reviews*. – 2010. – Т. 29. – № 3. – С. 483-502.

304. Sills M.A. [и др.]. [3H]CGP 39653: a new N-methyl-D-aspartate antagonist radioligand with low nanomolar affinity in rat brain // *European Journal of Pharmacology*. – 1991. – Т. 192. – № 1. – С. 19-24.

305. Singh V.K. [и др.]. Effects of whole-body gamma irradiation and 5-androstenediol administration on serum G-CSF // *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. – 2005. – Т. 27. – № 4. – С. 521-534.

306. Singh V.K. [и др.]. Radiation countermeasure agents: an update (2011-2014) // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. – 2014. – Т. 24. – № 11. – С. 1229-1255.

307. Singh V.K. [и др.]. Tocols induce G-CSF and mobilise progenitors that mitigate radiation injury // *Radiation Protection Dosimetry*. – 2014. – Т. 162. – № 1-2. – С. 83-87.

308. Singh V.K. Medical countermeasures for radiation exposure and related injuries: characterization of medicines, FDA-approval status and inclusion into the

strategic national stockpile / V.K. Singh, P.L. Romaine, T.M. Seed // *Health Physics*. – 2015. – Т. 108. – № 6. – С. 607-630.

309. Slamenová D. [и др.]. Oxidative/antioxidative effects of different lignin preparations on DNA in hamster V79 cells // *Neoplasma*. – 2000. – Т. 47. – № 6. – С. 349-353.

310. Smit M.J. [и др.]. Regulation of the human histamine H1 receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells // *British Journal of Pharmacology*. – 1996. – Т. 117. – № 6. – С. 1071-1080.

311. Smyth J.F. [и др.]. Glutathione reduces the toxicity and improves quality of life of women diagnosed with ovarian cancer treated with cisplatin: results of a double-blind, randomised trial // *Annals of Oncology*. – 1997. – Т. 8. – № 6. – С. 569-573.

312. Solovyev N.D. [и др.]. Anticancer activity and tissue distribution of platinum (II) complex with lignin-derived polymer of benzene-poly-carboxylic acids // *Journal of trace elements in medicine and biology*. – 2017. – Т. 43. – С. 72-79.

313. Soni M.G. [и др.]. Safety of vitamins and minerals: controversies and perspective // *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*. – 2010. – Т. 118. – № 2. – С. 348-355.

314. Sorensen R.G. Rat brain dendrotoxin receptors associated with voltage-gated potassium channels: dendrotoxin binding and receptor solubilization / R.G. Sorensen, M.P. Blaustein // *Molecular Pharmacology*. – 1989. – Т. 36. – № 5. – С. 689-698.

315. Sorenson J.R. Bis(3,5-diisopropylsalicylato)copper(II), a potent radioprotectant with superoxide dismutase mimetic activity / J.R. Sorenson // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 1984. – Т. 27. – № 12. – С. 1747-1749.

316. Sosa V. [и др.]. Oxidative stress and cancer: an overview // *Ageing Research Reviews*. – 2013. – Т. 12. – № 1. – С. 376-390.

317. Souza D.G. [и др.]. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury // *Journal of Immunology*. – 2004. – Т. 172. – № 4. – С. 2542-2548.

318. Speth R.C. Benzodiazepine receptors: temperature dependence of [3H]flunitrazepam binding / R.C. Speth, G.J. Wastek, H.I. Yamamura // *Life Sciences*. – 1979. – Т. 24. – № 4. – С. 351-357.
319. Stocco B. [и др.]. Biotransformed soybean extract induces cell death of estrogen-dependent breast cancer cells by modulation of apoptotic proteins // *Nutrition and Cancer*. – 2015. – Т. 67. – № 4. – С. 612-619.
320. Sun S.-N. [и др.]. Structural features and antioxidant activities of lignins from steam-exploded bamboo (*Phyllostachys pubescens*) // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2014. – Т. 62. – № 25. – С. 5939-5947.
321. Supic G. Epigenetics: a new link between nutrition and cancer / G. Supic, M. Jagodic, Z. Magic // *Nutrition and Cancer*. – 2013. – Т. 65. – № 6. – С. 781-792.
322. Tahara A. [и др.]. Pharmacological characterization of the human vasopressin receptor subtypes stably expressed in Chinese hamster ovary cells // *British Journal of Pharmacology*. – 1994. – Т. 112. – № 3. – С. 847-854.
323. Tamilmani P. Iron binding efficiency of polyphenols: Comparison of effect of ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on catechol and galloyl groups / P. Tamilmani, M.C. Pandey // *Food Chemistry*. – 2016. – Т. 197 (Part B). – С. 1275-1279.
324. Tatsumi M. [и др.]. Pharmacological profile of neuroleptics at human monoamine transporters // *European Journal of Pharmacology*. – 1999. – Т. 368. – № 2-3. – С. 277-283.
325. Thurmond R.L. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines / R.L. Thurmond, E.W. Gelfand, P.J. Dunford // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2008. – Т. 7. – № 1. – С. 41-53.
326. Tian Y. [и др.]. Effects and mechanisms of Bazhen decoction, Siwu decoction, and Sijunzi decoction on 5-fluorouracil-induced anemia in mice // *Journal of Traditional Chinese Medicine = Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan*. – 2016. – Т. 36. – № 4. – С. 486-495.
327. Tili E. [и др.]. Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor-suppressors and effectors of TGF β signaling pathway in SW480 cells // *Biochemical pharmacology*. – 2010. – Т. 80. – № 12. – С. 2057-2065.

328. Till J.E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells / J.E. Till, E.A. McCulloch // *Radiation Research*. – 1961. – Т. 14. – С. 213-222.
329. Tsang W.P. Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and induction of apoptosis in human cancer cells / W.P. Tsang, T.T. Kwok // *The Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2010. – Т. 21. – № 2. – С. 140-146.
330. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols / R. Tsao // *Nutrients*. – 2010. – Т. 2. – № 12. – С. 1231-1246.
331. Turusov V. Pathology of Tumours in Laboratory Animals, 2nd Edition, Volume 1: Tumours of the Rat (IARC Scientific Publication No. 99) : в 3 т. Т. 1 / V. Turusov, U. Mohr. – Lyon: IARC, 1990. – 740 с.
332. Turusov V., Mohr U. Pathology of Tumours in Laboratory Animals, 2nd Edition, Volume 2: Tumours of the Mouse (IARC Scientific Publication No. 111) : в 3 т. Т. 2 / V. Turusov, U. Mohr. – Lyon: IARC, 1994. – 800 с.
333. Ugartondo V. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources / V. Ugartondo, M. Mitjans, M.P. Vinardell // *Bioresource Technology*. – 2008. – Т. 99. – № 14. – С. 6683-6687.
334. Umegaki K. Whole body X-ray irradiation to mice decreases ascorbic acid concentration in bone marrow: comparison between ascorbic acid and vitamin E / K. Umegaki, S. Aoki, T. Esashi // *Free Radical Biology & Medicine*. – 1995. – Т. 19. – № 4. – С. 493-497.
335. Vahid F. [и др.]. The role dietary of bioactive compounds on the regulation of histone acetylases and deacetylases: a review // *Gene*. – 2015. – Т. 562. – № 1. – С. 8-15.
336. Vasin M.V. Comments on the mechanisms of action of radiation protective agents: basis components and their polyvalence / M.V. Vasin // *SpringerPlus*. – 2014. – Т. 3. – С. 414.
337. Vesnushkin G.M. [и др.]. Dose-dependent inhibitory effect of melatonin on carcinogenesis induced by benzo[a]pyrene in mice // *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*. – 2006. – Т. 25. – № 4. – С. 507-513.

338. Vinardell M.P. Lignins and their derivatives with beneficial effects on human health / M.P. Vinardell, M. Mitjans // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – T. 18. – № 6. – С. 1219.

339. Vinardell M.P. Potential applications of antioxidant lignins from different sources / M.P. Vinardell, V. Ugartondo, M. Mitjans // *Industrial Crops and Products*. – 2008. – T. 27. – № 2. – С. 220-223.

340. Wang C.-Z. Potential role of ginseng in the treatment of colorectal cancer / C.-Z. Wang, C.-S. Yuan // *The American journal of Chinese medicine*. – 2008. – T. 36. – № 6. – С. 1019-1028.

341. Wang G. [и др.]. Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-x1 // *PLoS ONE*. – 2012. – T. 7. – № 12. – С. e51764.

342. Wang H. Ginseng leaf-stem: bioactive constituents and pharmacological functions. / H. Wang, D. Peng, J. Xie // *Chinese medicine*. – 2009. – T. 4. – С. 20-20.

343. Wang J.B. [и др.]. Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment // *FEBS letters*. – 1994. – T. 338. – № 2. – С. 217-222.

344. Wang Q. [и др.]. Characterization of two water-soluble lignin metabolites with antiproliferative activities from *Inonotus obliquus* // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2015. – T. 74. – С. 507-514.

345. Wei J. [и др.]. Radiation-induced skin reactions: mechanism and treatment // *Cancer Management and Research*. – 2018. – T. 11. – С. 167-177.

346. Weindruch R. Caloric intake and aging / R. Weindruch, R.S. Sohal // *The New England journal of medicine*. – 1997. – T. 337. – № 14. – С. 986-994.

347. Weiss J.F. Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals / J.F. Weiss, M.R. Landauer // *Toxicology*. – 2003. – T. 189. – № 1-2. – С. 1-20.

348. Wilken R. [и др.]. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma // *Molecular Cancer*. – 2011. – T. 10. – С. 12.

349. Wirsdörfer F. The role of lymphocytes in radiotherapy-induced adverse late effects in the lung // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – Т. 7. – С. 591.
350. Withers H.R. Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation / H.R. Withers, M.M. Elkind // *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*. – 1970. – Т. 17. – № 3. – С. 261-267.
351. Wood M.E. [и др.]. Second malignant neoplasms: assessment and strategies for risk reduction // *Journal of Clinical Oncology*. – 2012. – Т. 30. – № 30. – С. 3734-3745.
352. Xu W. [и др.]. Protective effects of rosmarinic acid against radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice // *Journal of Radiation Research*. – 2016. – Т. 57. – № 4. – С. 356-362.
353. Yamamoto T. [и др.] Protective effects of EGCG on salivary gland cells treated with gamma-radiation or cis-platinum(II)diammine dichloride // *Anticancer Research*. – 2004. – Т. 24. – № 5A. – С. 3065-3073.
354. Yang F. [и др.]. Radix Bupleuri: a review of traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology, and toxicology // *BioMed Research International*. – 2017. – Т. 2017. – С. 7597596.
355. Yang Q. [и др.]. Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer by inducing g1 phase arrest and senescence in a Sirt1-dependent manner // *PLoS ONE*. – 2013. – Т. 8. – № 11. – С. e70627.
356. Yi J. [и др.]. Study on antitumor, antioxidant and immunoregulatory activities of the purified polyphenols from pinecone of *Pinus koraiensis* on tumor-bearing S180 mice in vivo // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – Т. 94. – № Pt A. – С. 735-744.
357. Yonezawa M. [и др.]. Increase in endogenous spleen colonies without recovery of blood cell counts in radioadaptive survival response in C57BL/6 mice // *Radiation Research*. – 2004. – Т. 161. – № 2. – С. 161-167.

358. You J.-S. [и др.]. Effect of YH0618 soup on chemotherapy-induced toxicity in patients with cancer who have completed chemotherapy: study protocol for a randomized controlled trial // *Trials*. – 2016. – Т. 17. – № 1. – С. 354.

359. Young A.J. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids / A.J. Young, G.M. Lowe // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2001. – Т. 385. – № 1. – С. 20-27.

360. Yuhas J.M. On mouse strain differences in radiation resistance: hematopoietic death and the endogenous colony-forming unit / J.M. Yuhas, J.B. Storer // *Radiation Research*. – 1969. – Т. 39. – № 3. – С. 608-622.

361. Zava D.T. [и др.]. Androgen receptor assay with [3H]-methyltrienolone (R1881) in the presence of progesterone receptors // *Endocrinology*. – 1979. – Т. 104. – № 4. – С. 1007-1012.

362. Zbikowska H.M. [и др.]. Polyphenolic-polysaccharide conjugates from plants of Rosaceae/Asteraceae family as potential radioprotectors // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – Т. 86. – С. 329-337.

363. Zhou Q.Y. [и др.]. Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors // *Nature*. – 1990. – Т. 347. – № 6288. – С. 76-80.

364. Zhou W. [и др.]. Dietary polyphenol quercetin targets pancreatic cancer stem cells // *International Journal of Oncology*. – 2010. – Т. 37. – № 3. – С. 551-561.

Благодарность

Автор выражает искреннюю благодарность научному консультанту чл.-корр. РАН, профессору Анисимову Владимиру Николаевичу за всестороннюю помощь в проведении диссертационного исследования.

Автор выражает глубокую признательность:

- профессору Перминовой И.В., Жеребкеру А.Я., а также сотрудникам лаборатории природных гуминовых систем кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и за помощь в проведении исследований ЯМР, МС ИЦРПФ и интерпретацию полученных данных о химическом составе композиций;
- доценту Бадуну Г.А. и сотрудникам кафедры радиохимии МГУ имени М.В. Ломоносова за помощь в проведении исследований фармакокинетики меченного тритием полифенольного лиганда;
- Осолодкину Д.И. (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») и Орлову А.А. (кафедра химии, МГУ имени М.В. Ломоносова) за помощь в проведении хемоинформационного анализа;
- сотрудникам ГНИИ ВМ МО РФ и НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ за помощь в организации и проведении исследований радиозащитной эффективности композиции ВР-С2;
- компании ООО Нобель (Санкт-Петербург, Россия) за предоставленные для исследования композиции;
- старшему научному сотруднику Федорос Елене Ивановне за помощь в фармакокинетическом моделировании;
- рабочему коллективу отдела онкоиммунологии, научной лаборатории канцерогенеза и старения и вивария ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России за помощь в проведении исследований композиции ВР-С3.