

На правах рукописи

Климович Анна Анатольевна

**Биомедицинские свойства
фармакологически перспективных вторичных метаболитов растений и
морских организмов**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной
степени кандидата биологических наук

Владивосток – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Попов Александр Михайлович

Официальные оппоненты:

Санина Нина Михайловна
доктор биологических наук,
Дальневосточный федеральный
университет, профессор кафедры
биохимии, микробиологии и
биотехнологии школы естественных наук.

Дышловой Сергей Анатольевич
доктор биологических наук,
Национальный научный центр морской
биологии им. А.В. Жирмунского ДВО
РАН, старший научный сотрудник
лаборатории фармакологии.

Ведущая организация:

Новосибирский институт органической
химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского
отделения Российской академии наук

Защита состоится **«16» марта 2021 г. в «10-00» часов** на заседании диссертационного совета Д 005.005.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (423) 231-40-50, e-mail: dissovet@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ТИБОХ ДВО РАН (г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН, www.piboc.dvo.ru).

Автореферат разослан 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н.



Чингизова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

С каждым годом всё большую актуальность приобретают проблемы поиска и разработки эффективных средств лечения и профилактики наиболее распространенных патологий, негативно влияющих на качество жизни современного человека. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области фармакологии и медицины, применение большинства существующих на сегодняшний день лекарственных препаратов до сих пор представляет большую проблему из-за их недостаточной эффективности и множества регистрируемых побочных эффектов. Поэтому важным и перспективным направлением является разработка новых лечебно-профилактических препаратов, биологически активных добавок (БАД), а также средств дополнительной терапии, повышающих эффективность и безопасность применения известных лекарственных агентов. Ими могут стать инновационные терапевтические средства, созданные на основе биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения, среди которых особое внимание исследователей привлекают вторичные метаболиты растений и морских организмов, которые проявляют выраженную фармакологическую активность, не оказывая при этом характерных для многих лекарственных препаратов побочных токсических эффектов.

В течение ряда лет нами проводился отбор и изучение медико-биологических свойств различных вторичных метаболитов. На экспериментальных животных моделях, имитирующих различные патологии человека, и дополняющих их тесты *in vitro* был проведен предварительный скрининг многочисленных природных БАВ и их синтетических аналогов, который позволил выявить ряд соединений, обладающих высокой терапевтической активностью. В круг фармакологически перспективных веществ вошли агенты, представляющие разные классы химических соединений, а именно: Rh2 – гликозид корня женьшеня *Panax ginseng*, смесь оксигенированных каротиноидов (СОК) (астаксантин, лютеин и зеаксантин) из морской звезды *Patiria pectinifera*, хиназолиновый алкалоид триптантрин (ТР) и его водорастворимое производное мостотрин (МТ), полученные путем органического синтеза. В ходе предварительных исследований были получены данные относительно противоаллергической, противовоспалительной, дерматопротекторной и противоопухолевой активности представленных соединений и проведено четкое ранжирование по их медико-биологическим свойствам.

Цель и задачи исследования

Провести углубленное исследование биомедицинских свойств указанных выше БАВ, а также определить возможные механизмы их фармакологического действия на клеточном и молекулярном уровне с использованием различных экспериментальных моделей *in vivo* и дополняющих их методов биотестирования *in vitro*.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить дерматопротекторное действие мазевого препарата «Коурохитин», главным действующим началом которого является ТР, на экспериментальных моделях кожных патологий *in vivo*, а именно: лоскутных и ожоговых ран и аллергического контактного дерматита, вызванного 2,4-динитрофторбензолом;
2. Определить выраженность противовоспалительной активности ТР с использованием экспериментальной модели системного воспаления, индуцированного липополисахаридом *in vivo*;
3. Проанализировать противоопухолевую активность водорастворимого производного ТР – МТ при изучении его антипролиферативного действия в отношении ряда линий опухолевых клеток *in vitro* и при экспериментальном моделировании асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха *in vivo*;
4. Определить особенности химиотерапевтического действия Rh2 в сочетании с известным противоопухолевым антибиотиком антрациклинового ряда доксорубицином на экспериментальной опухолевой модели асцитного и солидного вариантов аденокарциномы Эрлиха *in vivo*;

5. Установить влияние Rh2 на редокс-статус опухолевых и иммунных клеток *in vitro* с помощью селективного флуоресцентного индикатора внутриклеточного содержания активных форм кислорода – 2',7'-дигидрохлорфлуоресцеин-диацетата;

6. С использованием генно-инженерных репортерных технологий оценить влияние Rh2 на функциональную активность ключевых факторов транскрипции двух сигнальных систем: ядерного фактора 2 (Nrf2) и фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α), которые ответственны за включение адаптивных программ в клетке;

7. Оценить уровень канцерпривентивной, противоаллергической и противовоспалительной активности СОК при экспериментальном моделировании *in vivo* кожного канцерогенеза, аллергического контактного дерматита и системного воспаления, индуцированных 7,12-диметилбензантраценом, 2,4-динитрофторбензолом и липополисахаридом, соответственно.

Научная новизна и практическая значимость работы

Разработана новая оптимальная лекарственная форма известного алкалоида ТР – мазь «Коурохитин», содержащая 0,01% действующего вещества (ТР), 0,1% хитозана (носитель ТР), дистиллированную воду и ланолин-вазелиновую смесь (основа). Показано, что при моделировании кожных патологий *in vivo* «Коурохитин» обладает ярко-выраженным дерматопротекторным эффектом: снижает клинические проявления кожных аллергических реакций, оказывая при этом сильное противовоспалительное действие, а также ускоряет репаративные процессы в эпидермисе при раневых поражениях кожи. После проведения клинических испытаний, мазь «Коурохитин» может найти широкое применение в качестве универсального средства лечения различных заболеваний кожи.

Впервые были проведены исследования биомедицинских свойств нового синтетического производного ТР – МТ, обладающего большей растворимостью в воде и меньшей токсичностью. Установлено, что МТ оказывает избирательное антипролиферативное действие в отношении различных линий опухолевых клеток *in vitro*, проявляет противоопухолевую активность *in vivo* и повышает химиотерапевтический эффект доксорубина, при их совместном применении. Полученные результаты создают предпосылки для дальнейшего исследования МТ, как потенциального противоопухолевого средства.

Получены новые экспериментальные данные относительно медико-биологической активности и механизмов действия известного гинзенозида корня женьшеня Rh2. При моделировании опухолевого процесса *in vivo* показано, что Rh2 при проведении комбинированной химиотерапии повышает химиотерапевтическое действие и уменьшает иммуносупрессорный эффект доксорубина. Впервые установлено, что Rh2 на клеточном уровне выступает как прооксидант и «мягкий» регулятор активности редокс-чувствительного сигнального комплекса Keap1/Nrf2, что, возможно, связано с противоопухолевым, иммуномодулирующим и адаптогенным действием этого моногликозида.

Впервые предложен молекулярный механизм, объясняющий причины принципиально разного характера действия Rh2 на функциональную активность опухолевых (вызывает некроз или включение апоптотических программ) и иммунокомпетентных (индуцирует их активацию и запускает адаптивные программы) клеток, который связан со структурными и функциональными различиями в составе плазматических мембран этих клеток и с особенностями мембранотропного действия Rh2.

Обнаружено, что СОК, полученная из нового природного источника каротиноидов *P. pectinifera*, при моделировании кожного канцерогенеза, аллергических и воспалительных патологий является эффективным иммуномодулятором и корректором нарушений кожного гомеостаза, чем, вероятно, обусловлена выраженная противоаллергическая, противовоспалительная и канцерпривентивная активность этого средства. В дальнейшем, необходимо проведение предклинических испытаний СОК, как средства профилактики и лечения широкого спектра кожных заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Хиназолиновый алкалоид ТР в составе препарата «Коурохитин» – эффективный противовоспалительный агент и корректор патологических изменений кожи при моделировании аллергических и раневых процессов;
2. МТ – водорастворимое и значительно менее токсичное производное ТР, обладающее противоопухолевой активностью;
3. Гинзенозид Rh2 – эффективное средство комбинированной терапии, повышающее эффективность и безопасность противоопухолевого препарата доксорубицина, при моделировании онкологических заболеваний;
4. СОК – потенциальное лечебно-профилактическое средство, проявляющее канцерпревентивную, противоаллергическую и иммуномодулирующую активность.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов исследования и обоснованность выводов базируется на достаточном количестве наблюдений и методов статистического анализа полученных данных с использованием статистического пакета Microsoft Excel 2019.

Апробация работы и публикации

Результаты работы были представлены на объединенном иммунологическом Форуме (Россия, Нижний Новгород, 2013); Международном конгрессе «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии» (Россия, Москва, 2015); Научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология (иммунодиагностика, иммунопрофилактика и иммунотерапия)» (Крым, Ливадия, 2016); Научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам (ДВФУ ШЕН, Владивосток, 2017); Одиннадцатой международной конференции «Медицинская химия и фармацевтические технологии» (Чехия, Прага, 2019); Двадцать четвёртом мировом конгрессе «Достижения в онкологии» и симпозиуме «Молекулярная медицина» (Греция, Спарта, 2019); Научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам (ДВФУ ШЕН, Владивосток, 2020).

По теме диссертации опубликовано 22 работы: 12 статей в журналах, 3 патента, 7 тезисов в сборниках научных трудов по материалам конференций.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 120 страницах, содержит 23 рисунка и 7 таблиц. Список литературы содержит 213 источников.

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова (ТИБОХ) ДВО РАН.

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в планировании и проведении экспериментальной работы, в обработке и анализе полученных данных, в подготовке научных публикаций и текста диссертации.

Благодарности

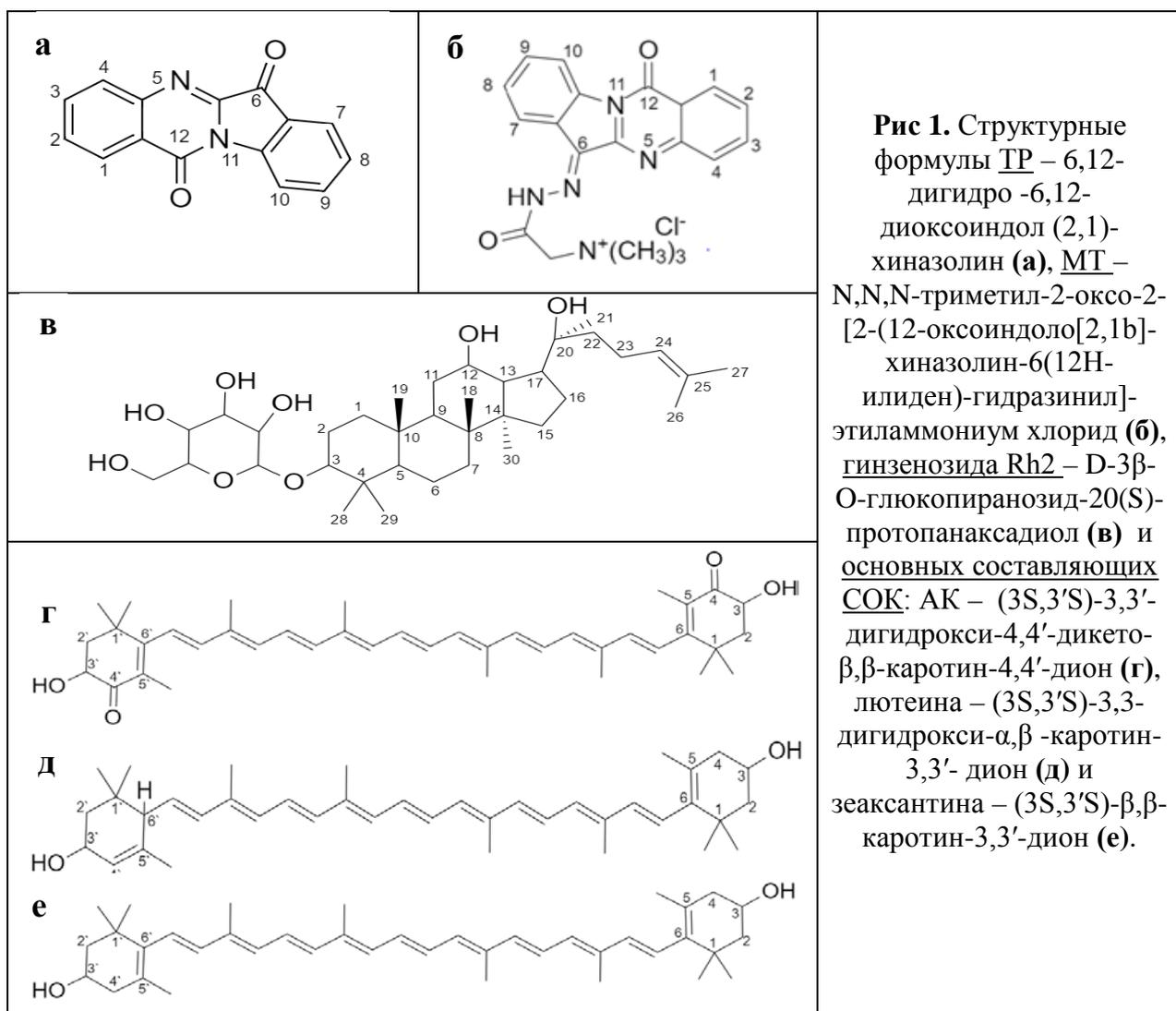
Автор выражает искреннюю благодарность: своему научному руководителю д.б.н. Попову А.М. за неоценимую помощь в выполнении диссертации, постоянное внимание к работе, ценные замечания и полезные советы на всех этапах исследования, академику РАН Стонику В.А., доценту Дальневосточного федерального университета (ДВФУ), к.х.н. Московкиной Т. В., зав. лаб. биотехнологии, д.б.н. Артюкову А.А., с.н.с. Атопкиной Л.Н., за любезное предоставление для тестирования исследуемых в данной работе веществ, а также всем коллегам из лабораторий ТИБОХ ДВО РАН и других институтов, которые участвовали в проведении и обработке экспериментальных данных, представленных в данной работе.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Материалы и методы исследования

1.1 Объекты исследования

Хиназолиновый алкалоид триптантрин (ТР) был получен из изатина путем органического синтеза на опытном производстве ТИБОХ ДВО РАН. Для повышения биодоступности ТР, в качестве его носителя использовали хитозан. Так была разработана и запатентована лекарственная форма ТР, получившая название «Коурохинтин». Препарат представляет собой водно-гелевую суспензию, в которой ТР равномерно распределён в хитозане. При моделировании дерматологических заболеваний «Коурохинтин» использовали в виде мази следующего состава: ТР – 0,01%, хитозан – 0,1%, дистиллированная вода и ланолин-вазелиновая смесь (1:3, по весу) – всё остальное. Для внутривенных (в/в) инъекций ТР растворяли в водном растворе диметилсульфоксида (10:1, по объёму).



Водорастворимое производное ТР – мостотрин (МТ) было получено путем органического синтеза сотрудниками ДВФУ совместно с лабораторией химии морских организмов ТИБОХ ДВО РАН под руководством доцента, к.х.н. Московкиной Т.В. и академика РАН Стоника В.А. Синтез МТ проводился в реакции ТР с реагентом Жирара в ледяной уксусной кислоте на глицериновой бане при 90°C. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* МТ использовали в виде водного раствора.

Гинзенозид Rh2 был получен в ТИБОХ ДВО РАН пятиступенчатым органическим синтезом из бетулафолиентриола с.н.с. Атопкиной Л.Н. Как в экспериментах *in vivo*, так и в тестах *in vitro* Rh2 применяли в водно-спиртовом растворе (50:1, по объему).

Смесь оксигенированных каротиноидов (СОК) была выделена из морской звезды *P. pectinifera* прямой экстракцией 96%-ным раствором этилового спирта сотрудниками лаборатории биотехнологии ТИБОХ ДВО РАН под руководством д.б.н. Артюков А.А. Методом ВЭЖХ было установлено, что доминирующим компонентом экстракта является АК (около 30-50%), также в состав СОК входят лютеин и зеаксантин, окистероиды и свободные жирные кислоты. 1%-ный мазевой препарат СОК готовили на ланолин-вазелиновой основе (1:3, по весу). Для в/б инъекций или *per os* СОК использовали в виде водной суспензии.

1.2 Экспериментальные животные

Эксперименты *in vivo* выполнены на белых беспатогенных мышах линии CD-1 и BALB/c, которые были получены из питомника лабораторных животных «Пушино» и разведены в виварии ТИБОХ ДВО РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом на полнорационнй сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92). Эксперименты были выполнены согласно методическим руководствам, нормативным документам и правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 53434-2009).

1.3 Методы исследования

1.3.1 Для исследования биомедицинских свойств указанных БАВ *in vivo* использовали признанные экспериментальные животные модели, имитирующие различные патологии человека:

Аллергический контактный дерматит (АКД). Дерматит воспроизводили с помощью облигатного аллергена 2,4-динитрофторбензола (ДНФБ) (Sigma, США), который растворяли в смеси ацетон:оливковое масло (4:1, по объёму) и наносили сначала однократно на выбритый участок брюшины по 0,1 мл 0,5%-ной смеси для сенсибилизации, а через 6 дней двукратно на внутреннюю и внешнюю поверхность уха по 0,02 мл 0,02%-ной смеси, для получения обширного заболевания. В ходе эксперимента в каждой группе ежедневно фиксировали выраженность эритемы (покраснение и уплотнение участка воспалённого кожного покрова с гиперемией и образованием поверхностной гемморагической корки) по бальной шкале Суворова. В качестве препарата сравнения использовали коммерческую мазь «Фуцидин» (Лео Лэбораторис Лимитед, Ирландия).

Модель термических и лоскутных ран. Термические раны наносили нагретым на кипящей водяной бане медным стержнем с плоским торцом диаметром 6 мм, который прижимали на 5-6 сек к выбритому участку кожи животного. Для получения лоскутных ран участок кожи размером 1 мм срезали с помощью глазных ножниц. В каждой группе животных проводили оценку состояния раневой поверхности: размер струпа, наличие периферической эпителизации, отечность и гиперемия краев раны. Степень заживления определяли по изменению размера раны, для этого к ней прикладывали покровное стекло, переносили на него контуры раны, которые затем оцифровывали с помощью сканера в графический файл формата «ВМР». Площадь ран определяли с помощью программы Adobe Photoshop CS (version 8.0). В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие мази «Фуцидин» и «Метилурацил» (Нижфарм АО, Россия).

Онкологические модели. В эксперименте использовали первичную культуру клеток перевиваемого штамма асцитной карциномы Эрлиха, полученной из семидневных мышей носителей опухоли линии CD-1. Асцитный вариант карциномы Эрлиха моделировали путём в/б трансплантации опухолевых клеток (3×10^6 кл./мышь), а солидный вариант путём их п/к трансплантации во внутреннюю часть бедра ($1,5 \times 10^6$ кл./мышь). Противоопухолевый эффект при асцитном варианте оценивали по параметрам выживаемости экспериментальных животных, а при солидном по размеру, весу и интенсивности роста прикреплённой опухоли, с последующим расчётом торможения роста опухоли в опытных

группах (ТРО, %). В качестве препарата сравнения использовали противоопухолевый препарат «Доксорубин-Тева» (ДР) (Pharmachemie, Нидерланды).

Модель кожного канцерогенеза. Кожный канцерогенез был вызван 7,12-диметилбензантраценом (ДМБА) (Sigma, США), который растворяли в бензоле до 0,01%-ного раствора и наносили на выбритую межлопаточную область экспериментальных животных по 0,1 мл 3 раза в неделю в течение 8 недель. В каждой группе животных еженедельно оценивали изменение количества животных с опухолью и патоморфологические изменения тканей: размер (диаметр, мм) и количество опухолевых образований. В качестве положительного контроля была выбрана розмариновая кислота (РК) (Sigma, США).

Системное воспаление (СВ). СВ индуцировали липополисахаридом (ЛПС) из *Escherichia coli* (Sigma, США), который вводили в/б в дозе 0,1 мг/кг спустя 1 час после введения исследуемых соединений. Через полтора часа после индукции СВ проводили заборы крови для проведения иммунологических и биохимических анализов. В качестве положительного контроля использовали глюкокортикостероидный коммерческий препарат «Офтан-Дексаметазон» (Сантэн АО, Финляндия).

Биохимические, гематологические и иммунологические анализы. Функциональное состояние иммунной системы при моделировании указанных патологий оценивали по результатам иммуноферментного анализа (ИФА), с использованием диагностических наборов (BD Bioscience OptEIA US), предназначенных для измерения уровня цитокинов в биообразцах, а именно: интерлейкины-1, 2, 4, 6, 10 и 17 (ИЛ-1, 2, 4, 6, 10, 17), интерферон-гамма (ИФН- γ), фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ). Выраженность свободно-радикальных процессов при патологических состояниях определяли по содержанию в крови продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (Sigma, США), а именно по концентрации малонового диальдегида (МДА). Для оценки влияния исследуемых БАВ на общее состояние организма: степень нарушения процессов кроветворения, функции печени и желчевыводящих путей, проводили анализ на общий билирубин с помощью набора Новоглюк-КМ («Вектор-Бест», Россия). Гематологический анализ проводили на анализаторе CELL-DYN 3700 (USA).

1.3.2 При изучении механизмов действия исследуемых БАВ на молекулярном и клеточном уровне использовали следующие тесты *in vitro*:

С помощью МТТ-теста было проведено сравнительное исследование цитотоксической активности МТ и ТР в отношении следующих линий опухолевых клеток: НСТ-116 (аденокарцинома толстой кишки), К-562 (промиелоцитарный лейкоз), МСF-7 (инвазивная карцинома протоков молочной железы) MDA-MB-231 (клетки рака молочной железы). Все линии клеток дикого типа были приобретены в АТСС (США). В качестве контрольного препарата был использован «Доксорубин» (Sigma, USA).

В анализе редокс-свойств Rh2 уровень АФК в первичных культурах опухолевых (аденокарциномы Эрлиха) и иммунокомпетентных (спленоциты селезенки) клеток измеряли с помощью селективного флуоресцентного индикатора внутриклеточного содержания АФК 2',7'-дигидрохлорфлуоресцеин-диацетата (H2ДХФДА) (Sigma, США), который проявляет преимущественную чувствительность к H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$. Флуоресценцию проб измеряли на планшетном ридере Fluoroscan Ascent FL (Labsystems, USA).

Оценку степени влияния Rh2 на функциональную активность факторов транскрипции Nrf2 и Hif1- α проводили с помощью генных репортерных конструкций, транслирующих информацию о синтезе отдельных регуляторных доменов этих белков, а именно: домена Neh2 и кислород-зависимого домена (ODD), соответственно, слитых с репортерным геном люциферазы (luc). Химерные конструкции Neh2-luc и HIF ODD-luc, моделирующие активность Nrf2 и HIF-1 α , были трансфицированы в клеточную линию нейробластомы человека SH-SY5Y. Эффективность активирующего действия Rh2 на Neh2-luc и HIF ODD-luc конструкции определяли по люциферазной активности (относительная люминесценция проб), которую измеряли с помощью набора SteadyGlo™ (Promega),

содержащего субстрат для люциферазы – люциферин, на планшетном спектрофотометре (SpectraMax M5e, USA).

Статистическую и графическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием статистического пакета Microsoft Excel 2007. Полученные значения выражали в виде среднее \pm стандартное отклонение. Достоверность различий определяли с помощью параметрического *t*-критерия Стьюдента. За достоверные принимали различия при $p \leq 0,05$.

2 Результаты и обсуждения

2.1 Дерматопротекторное и противовоспалительное действие триптантрина

Согласно многочисленным литературным и экспериментальным данным, ТР обладает ярко выраженной противовоспалительной, ранозаживляющей и антимикробной активностью (Yurngdong 2013; Kaur et al., 2017). Очевидно, что именно с этими видами медико-биологической активности связана способность ТР в составе наружного средства «Коурохитин» оказывать протективное действие при экспериментальном моделировании различных дерматологических нарушений, в частности аллергических заболеваний и раневых повреждений кожи. При этом в ходе скрининговых экспериментов был определён оптимальных режим применения мази «Коурохитин». Установлено, что наиболее выраженный терапевтический эффект проявлялся при использовании мази, содержащей 0,01% ТР, в курсе лечения не более 4-5 дней.

2.1.1 Противоаллергическая активность мазевого препарата «Коурохитин».

Зарегистрированные в ходе эксперимента внешние патологические и иммунологические показатели (рис. 2 и 3) свидетельствуют о том, что мазь «Коурохитин» оказывает выраженный противоаллергический эффект. Из данных, приведенных на рисунке 2, видно, что четырёхдневный курс лечения мазью «Коурохитин» приводил к практически полному восстановлению исходных параметров кожного покрова, уменьшая выраженность эритемы приблизительно в 7 раз. При этом мазь «Фуцидин» способствовала лишь двукратному снижению эритемы, что не отличалось от группы К(-)

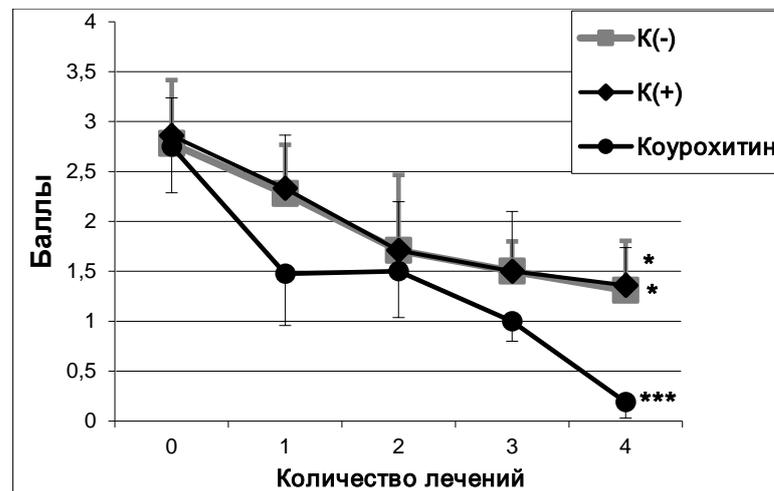


Рис. 2. Показатели выраженности эритемы в баллах от 0 до 4 (ось ординат), вызванной ДНФБ, в разных группах животных после каждого дня лечения (ось абсцисс): К(-) – отрицательный контроль (без лечения); К(+), – положительный контроль «Фуцидин»; Коурохитин – мазь, содержащая 0,01% ТР. Результаты представлены как среднее \pm SD (при $n = 8$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{***}$ (парный тест Стьюдента).

Иммунологический анализ крови показал (анализ проводили спустя 24 часа после последнего лечения), что при АКД мазь «Коурохитин» оказывала заметное цитокин-ингибирующее действие в отношении основных провоспалительных цитокинов,

участвующих в аллергическом процессе, а именно: ИЛ-2, ИФН- γ , ФНО- α и ГМ-КСФ, уровень которых повышался в группе К(-). Полученные данные свидетельствуют о наличии противовоспалительной активности мази «Коурохитин», чем обусловлена её способность выступать в качестве эффективного корректора клинических проявлений АКД.

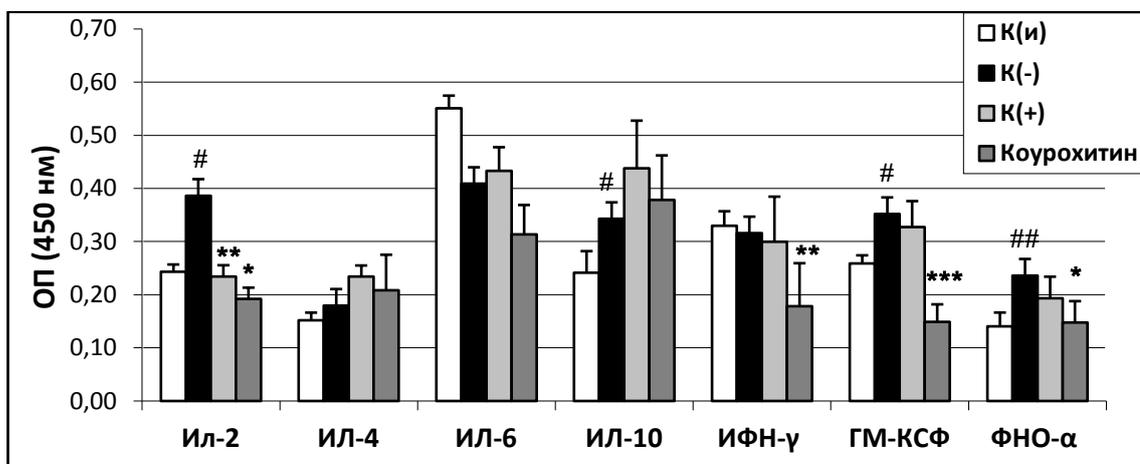


Рис. 3. Содержание цитокинов при моделировании АКД. Ось ординат – оптическая плотность проб при 450 нм, отражающая уровень цитокинов в сыворотке крови животных разных экспериментальных групп: К(и) – интактный контроль; К(-) – отрицательный контроль; К(+)
– положительный контроль «Фуцидин»; «Коурохитин» – мазь, содержащая 0,01% ТР. Результаты представлены как среднее \pm SD (при n = 8), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$, в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{##}$, группа К(-) в сравнении с группой К(и) (тест Стьюдента).

2.1.2 Оценка ранозаживляющего действия мази «Коурохитин» в отношении термических и лоскутных ран. В результате эксперимента было показано, что применение мази «Коурохитин» в течении 5 дней ускоряло процесс заживления, как термических, так и лоскутных ран (таблица 1).

Таблица 1. Сравнительная оценка действия мази «Коурохитин» и коммерческих препаратов наружного применения на процесс заживления ожоговых и лоскутных ран

Группа	Термические раны		Лоскутные раны	
	7 день	12 день	7 день	12 день
	Заживление, %	Заживление, %	Заживление, %	Заживление, %
К(-) (без лечения)	61,2 \pm 5,6	91,5 \pm 4,2	66,8 \pm 5,6	92,3 \pm 3,7
«Фуцидин»	78,2 \pm 6,2	93,0 \pm 5,0	77,5 \pm 7,2	98,5 \pm 4,2
«Метилурацил»	71,6 \pm 6,4	97,0 \pm 4,6	78,6 \pm 7,3	94,8 \pm 4,0
«Коурохитин»	79,2 \pm 6,7	100 \pm 0 [*]	80,3 \pm 4,5 ^{**}	100 \pm 0 [*]

Примечание: Результаты представлены как среднее \pm SD (при n = 9), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$ в сравнении с группой К(-) (тест Стьюдента).

Лечебный эффект препарата «Коурохитин», который оценивался в течение всего эксперимента, достигал максимальной 100%-ной величины на 12 день после индукции раневого процесса и был выше, чем у коммерческих препаратов сравнения «Фуцидин» и «Метилурацил». Необходимо отметить, что выраженная ранозаживляющая активность мази «Коурохитин» обусловлена не только противовоспалительными свойствами основного активного начала – ТР, но и присутствием хитозана в её составе. Хитозан, помимо увеличения биодоступности ТР, обеспечивает ещё и окклюзию повреждённой

поверхности эпидермиса, что способствует более пролонгированному действию ТР и ускоряет биосинтез коллагена, что необходимо для репарации повреждённых участков.

2.1.3 Оценка противовоспалительной активности ТР на модели СВ. При моделировании СВ было показано, что в ответ на введение животным ЛПС (группа К(-)) наблюдалось резкое повышение сывороточного содержания анализируемых провоспалительных цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-6 и ФНО- α) (рисунок 4 а). Оценка влияния ТР на цитокиновый статус показала, что ТР оказывал слабое влияние на содержание ИФН- γ , но более чем в три раза снижал уровни ИЛ-6 и ФНО- α по сравнению с группой К(-).

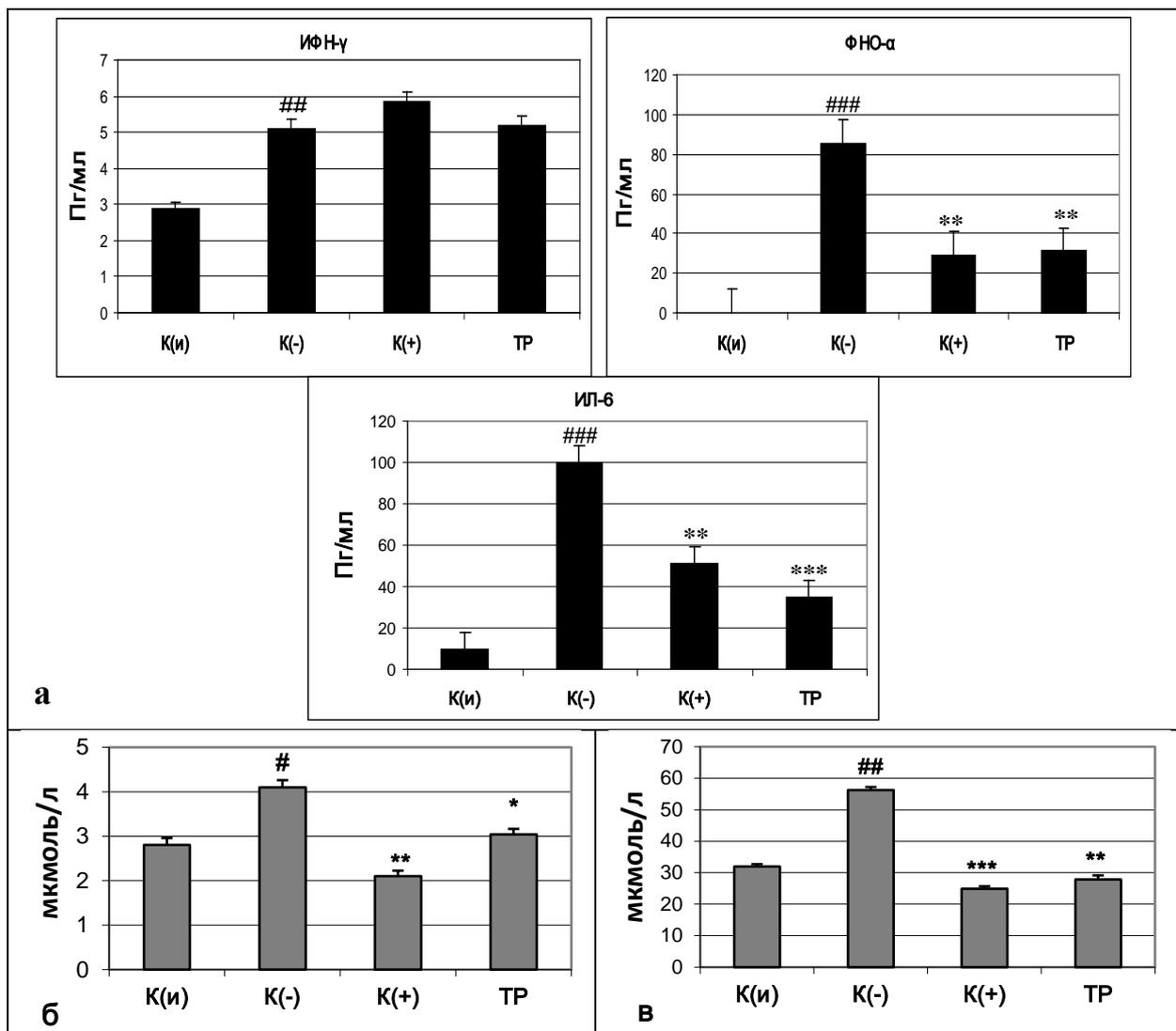


Рис. 4. Уровень провоспалительных цитокинов (а) (ось ординат в пг/мл), МДА (б) и общего билирубина (в) (ось ординат в мкмоль/л) в сыворотке крови животных разных экспериментальных групп: К(и) – интактный контроль, К(-) – отрицательный контроль (без лечения), К(+)
– положительный контроль «Офтан-Дексаметазон» 1 мг/кг, ТР – трипантрин 1мг/кг. Результаты представлены как среднее \pm SD (при n = 6), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{\##}$, $P \leq 0,01^{\###}$ группа К(-) в сравнении с группой К(и) (тест Стьюдента).

При оценке общего состояния организма экспериментальных животных и его антиоксидантной системы защиты было показано, что в группе К(-) содержание билирубина и МДА в сыворотке крови увеличивалось в 1,5 раза по сравнению с группой К(и) (рис. 4 б, в). Применение ТР приводило в норму данные биохимические показатели (соответствовало группе интактных животных).

Наблюдаемый противовоспалительный эффект, вероятно, осуществляется за счёт способности ТР подавлять активность рецепторов и сигнальных путей, принимающих

активное участие в стимуляции синтеза цитокинов. Например, TP известный антагонист Толл-подобных рецепторов-4 (TLR4), лигандом которого является ЛПС и многие аллергены. Также TP ингибирует активность рецептора фактора роста сосудов эндотелия (VEGFR), ядерного фактора-кВ (NF-кВ), сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции (STAT) и других сигнальных белков (Mahesh et al., 2016; Wang et al., 2018; Ito et al., 2010; Chang et al., 2019).

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что зарегистрированное терапевтическое действие мази «Коурохитин» при различных дерматологических осложнениях, во многом является результатом противовоспалительной, в частности цитокин-ингибирующей, активности его главного действующего вещества – TP.

2.2 Определение противоопухолевого потенциала мостотрина

Мостотрин (MT) – новое производное алкалоида триптантрина (TP), которое представляет собой фармакологически перспективное средство, обладающее противоопухолевым действием. MT по сравнению со своим предшественником TP обладает следующими характеристиками: хорошая растворимость в воде, что облегчает его применению в виде водных растворов, как при энтеральных, так и парантеральных маршрутах введения; более низкая токсичность (LD50 MT = 375 мг/кг, LD50 TP = 75 мг/кг); отсутствие иммуносупрессорного действия. Отмеченные преимущества значительно повышают безопасность и эффективность терапевтического использования MT при лечении онкологических заболеваний.

2.2.1 Сравнительное исследование антипролиферативной активности MT и TP в отношении различных линий опухолевых клеток. В результате проведенного тестирования было показано, что MT ингибировал рост всех используемых линий клеток, за исключением B16 (таблица 2), хотя существенно уступал в эффективности доксорубину (ДР), который был использован в качестве положительного контроля. При этом антипролиферативная активность MT в отношении клеточных линий НСТ-116, К-562 и MCF-7 была в 5-40 раз выше, чем у TP.

Таблица 2. Антипролиферативная активность TP и MT *in vitro* в сравнении с ДР

Вещества	IC ₅₀ , μM				
	НСТ-116	MCF-7	B16	К-562	MDA-MB-231
MT	5,0 ± 0,4**	11,0 ± 0,9**	>50	1,0 ± 0,1**	46,0 ± 2,7
TP	>50	>50	48,3 ± 3,9	42,4 ± 3,2	21,2 ± 1,7
ДР	0,11 ± 0,02	0,61 ± 0,05	0,55 ± 0,05	0,10 ± 0,01	0,52 ± 0,05

Примечание: НСТ-116 – клетки аденокарциномы толстой кишки, К-562 – клетки промиелоцитарного лейкоза, MCF-7 – клетки инвазивной карциномы протоков молочной железы, MDA-MB-231 – клетки рака молочной железы. IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования (минимальная концентрация, ингибирующая рост клеток на 50%). Результаты представлены как среднее ± S.E.M (при n=3). P ≤ 0,05*, P ≤ 0,01** MT в сравнении с TP (тест Стьюдента).

Зарегистрированное антипролиферативное действие MT в отношении различных линий опухолевых клеток позволяет рассматривать его в качестве потенциального действующего агента противоопухолевых препаратов для лечения разных видов опухолей.

2.2.2 Эффективность комбинированной терапии ДР с MT при моделировании асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха. Согласно данным, представленным в таблице 3, ДР при монотерапии оказывал выраженное химиотерапевтическое действие, повышая параметры выживаемости животных носителей опухоли. MT в используемых дозах при самостоятельном применении обладал незначительным противоопухолевым действием, проявляя максимальный терапевтический эффект в дозе 10 мг/кг.

Таблица 3. Расчёт СПЖ, УПЖ и выживаемости животных разных экспериментальных групп

Группа	СПЖ, дни	УПЖ, %	Выживаемость, %
K(-) (без лечения)	17,0 ± 0,17	-	0
ДР (0,25 мг/кг)	57,5 ± 0,2 **	338,0 ± 0,5	67
МТ (5 мг/кг)	25,7 ± 0,47	151,2 ± 1,11	10
МТ (10 мг/кг)	29,1 ± 0,45	171,2 ± 1,06	10
ДР+МТ (0,25 мг/кг + 5 мг/кг)	58,9 ± 0,16 **	346,5 ± 0,4	78
ДР+МТ (0,25 мг/кг + 10 мг/кг)	60,0 ± 0,2 **	352,9 ± 0 #	100

Примечание: СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение средней продолжительности жизни животных; Выживаемость животных – % выживших животных к моменту терминации эксперимента (60 дней с индукции опухоли). Курс лечения - 5 ежедневных в/б инъекций. Результаты представлены как среднее ± SD (при n =9), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$ в сравнении с группой K(-); $P \leq 0,05^{\#}$ группы ДР+МТ 5-10 мг/кг в сравнении с группой ДР (тест Стьюдента).

Совместное использование МТ и ДР значительно повышало эффективность химиотерапии. Об этом свидетельствуют более высокие параметры выживаемости в группах животных ДР+МТ 5 мг/кг и ДР+МТ 10 мг/кг по сравнению с группой, прошедшей монотерапию ДР. При этом в дозе 10 мг/кг МТ оказывал более выраженный потенцирующий эффект к ДР, чем в дозе 5 мг/кг. Следует отметить, что во время скрининговых исследований ТР в составе препарата «Коурохитин» не проявлял заметного терапевтического эффекта на модели карциномы Эрлиха.

Таким образом, направленный синтез нового хиназолинового алкалоида МТ (на структурной платформе ТР) привел не только к повышению его растворимости и безопасности терапевтического применения, но и повысил его противоопухолевую активность. Полученные результаты позволяют рассматривать МТ в качестве потенциального средства для терапии онкологических заболеваний.

2.3 Исследование противоопухолевой активности и механизмов действия гинзенозида Rh2

В качестве основных действующих веществ корня женьшеня вида *P. ginseng*, получившего широкую известность благодаря своей разнообразной фармакологической активности, выступают гинзенозиды, относящиеся к группе тритерпеновых гликозидов даммаранового ряда. Считается, что из всех гинзенозидов женьшеня наиболее высоким медико-биологическим потенциалом обладает Rh2. Многократно показано, что Rh2 проявляет противоопухолевую, иммуномодулирующую и адаптогенную активность (Поров, 2011; Jin et al., 2018). Поэтому Rh2 часто рассматривается как перспективное средство дополнительной противоопухолевой терапии, позволяющее повысить эффективность известных противоопухолевых препаратов, таких как доксорубин (ДР), и одновременно нивелировать побочные эффекты, которыми сопровождается химиотерапия.

2.3.1 Противоопухолевый потенциал Rh2 при комбинированной терапии с ДР на модели асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха. Как показал эксперимент (таблица 4), Rh2 самостоятельно оказывал заметное противоопухолевое действие, повышая параметры выживаемости животных приблизительно в 3 раза по сравнению с группой K(-). ДР увеличивал эти параметры в 3,5 раза. Однако известно, что недостатками ДР являются короткий период ремиссии, после которого часто наблюдается рецидив опухоли с приобретением лекарственной резистентности опухолевыми клетками (Tasar et al., 2013). Поэтому характерно, что в группе животных, прошедших курс монотерапии ДР, период ремиссии составлял 30-40 суток, затем отмечалось возобновление роста опухоли, с чем связан относительно низкий уровень выживаемости экспериментальных животных.

Таблица 4. Расчёт СПЖ, УПЖ и выживаемости животных разных экспериментальных групп

Группа	СПЖ, дни	УПЖ, %	Выживаемость, %
K(-) (без лечения)	20,7 ± 1,3		0
ДР (0,25 мг/кг)	72,2 ± 2,9**	248	37,5
Rh2 (10 мг/кг)	65,6 ± 2,7**	216	20
Rh2 + ДР (0,25 мг/кг + 10 мг/кг)	95,0 ± 1,9***, #	359 #	80

Примечание: СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение средней продолжительности жизни; Выживаемость животных – % выживших животных к моменту терминации эксперимента (100 дней после индукции опухоли). Курс лечения - 5 ежедневных в/б инъекций. Результаты представлены как среднее ± SD (при n = 7), P ≤ 0,05*, P ≤ 0,01**, P ≤ 0,01***, в сравнении с группой K(-); P ≤ 0,05#, группа ДР в сравнении с группой ДР+Rh2 (тест Стьюдента).

Сочетанное применение ДР и Rh2 приводило к взаимному потенцированию их противоопухолевого действия, что выражалось в значительном увеличении продолжительности жизни и выживаемости экспериментальных животных и подавлении рецидива опухолевого роста после периода ремиссии. Кроме того, в группе Rh2 + ДР к концу эксперимента количество выживших животных, не имеющих опухолевых зачатков и видимых признаков побочных токсических эффектов, было в 2,5-4 раза больше, чем в группах, прошедших монотерапию ДР или Rh2, соответственно. Необходимо отметить, что терапевтические дозы ДР составляют от 0,5 до 4,5 мг/кг. В данном эксперименте доза ДР была снижена до 0,25 мг/кг, которая в сочетании с Rh2 оказала выраженное противоопухолевое действие, при видимом отсутствии побочных эффектов. Следовательно, Rh2 в качестве вспомогательного средства, позволит применять ДР в более низких безопасных дозах.

2.3.2 Влияния комбинированной терапии Rh2 с ДР на иммунологический статус организма при опухолевом процессе. Из множественных побочных проявлений ДР, одним из самых серьёзных считается иммуносупрессорный эффект, связанный с его токсическим действием на кроветворные клетки. Поэтому в следующей серии экспериментов на модели асцитной аденокарциномы Эрлиха было оценено влияние комбинации ДР и Rh2 на иммунологический статус организма при химиотерапии по изменению содержания некоторых цитокинов в сыворотке крови онкологических животных (рис. 5).

Эксперимент был проведён в два этапа. На первом этапе у части животных каждой группы кровь для анализа брали спустя 7 суток после инокуляции опухоли. В этот период у животных всех экспериментальных групп достоверных сдвигов в показателях сывороточного уровня цитокинов не было зарегистрировано. На втором этапе содержание цитокинов было измерено через 60 суток после индукции опухоли у животных, находящихся в периоде ремиссии опухолевого процесса. В этом случае было показано, что в группе K(-) и ДР наблюдалось угнетение активности иммунной системы. В экспериментальной группе животных ДР+Rh2 было зарегистрировано увеличение содержания ИФН-γ и ФНО-α – ключевых цитокинов, принимающих участие в противоопухолевом иммунном ответе, при одновременном снижении главного противовоспалительного цитокина ИЛ-10.

Полученные данные говорят о способности Rh2 повышать иммунный статус организма, что опосредованно усиливает противоопухолевый эффект этого гинзенозида и снижает иммунодепрессивное действие ДР.

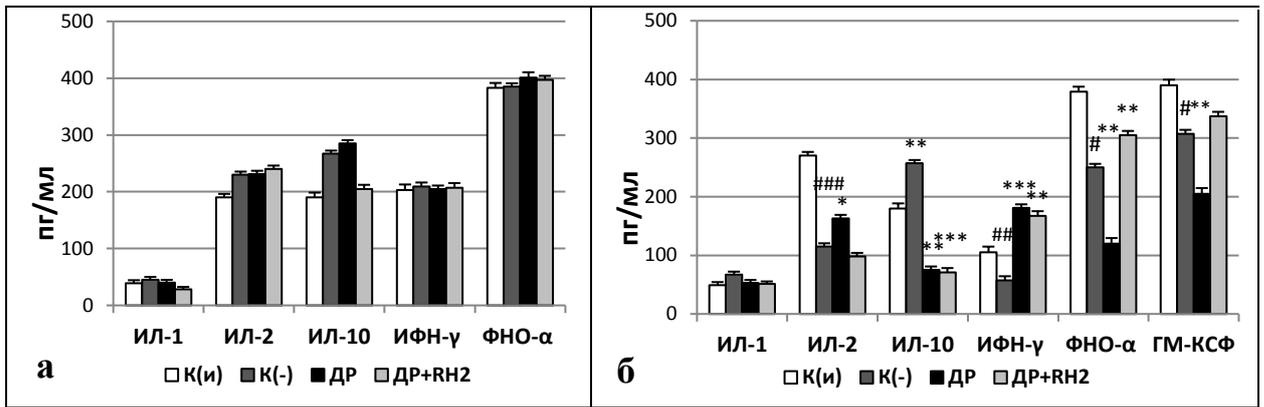


Рис. 5. Содержание цитокинов (ось ординат, в пг/мл) в сыворотке крови мышей с асцитной карциномой Эрлиха спустя 9 суток (**а**) и 60 суток (**б**), после инокуляции опухоли. Группы животных: К(и) – интактный контроль; К(-) – отрицательный контроль (без лечения); ДР – «Доксорубицин-Тева» (0,25 мг/кг); ДР+Rh2 – «Доксорубицин-Тева» (0,25 мг/кг) + Rh2 (10 мг/кг). Результаты представлены как среднее \pm SD (при $n = 6$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, опытные группы в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^\#$, $P \leq 0,01^{##}$, $P \leq 0,01^{###}$ группа К(-) в сравнении с группой К(и) (тест Стьюдента).

2.3.3 Противоопухолевый потенциал Rh2 при комбинированной терапии с ДР на модели солидного варианта аденокарциномы Эрлиха. Оценку влияния Rh2, ДР и их сочетания на динамику опухолевого роста исследовали, как на стадии формирования опухоли, так и на стадии её интенсивного роста (рис. 6 и 7).

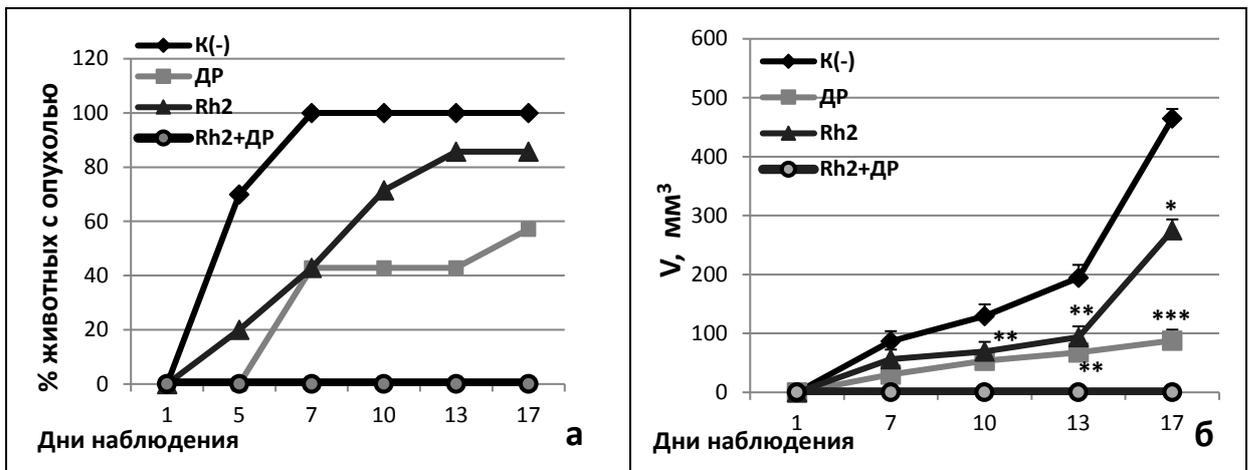


Рис. 6. Динамика роста солидной опухоли. Ось абсцисс – срок эксперимента в сутках, ось ординат – изменение количества животных с опухолью (**а**) и объёма сформировавшейся опухоли (**б**) у животных разных экспериментальных групп: К(-) – отрицательный контроль (без лечения); ДР – «Доксорубицин-Тева» (0,25 мг/кг); ДР+Rh2 – «Доксорубицин-Тева» (0,25 мг/кг) + Rh2 (10 мг/кг). Результаты представлены как среднее \pm SD (при $n = 7$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, опытные группы в сравнении с группой К(-) (тест Стьюдента).

В первом случае, лечение (5 ежедневных подкожных инъекций во внутреннюю часть бедра) начинали спустя сутки после инокуляции опухолевых клеток. При этом на 7 день после трансплантации опухолевых клеток в группе К(-) у 100%-тов животных было зафиксировано образование солидного опухолевого узла со средним размером $86 \pm 0,039$ мм³, который увеличивался до $460 \pm 0,039$ мм³ к концу эксперимента (17 день). В группе животных, прошедших курс монотерапии ДР и Rh2, на 7 день только у 43%-тов особей были обнаружены первые опухолевые зачатки. К термине эксперимента в группе ДР количество животных со средним размером опухоли $83 \pm 0,061$ мм³ достигало 57%, а в

группе Rh2 86% со средним объемом опухоли $207 \pm 0,044 \text{ мм}^3$ (рис. 6). При этом монотерапия ДР и Rh2 приводила к заметному торможению опухолевого роста, который определяли по процентному отношению опухолевой массы, измеренной на 17 день эксперимента, между опытными и контрольной группами: К(-) – вес опухоли = $0,276 \pm 0,174 \text{ г}$; ДР – вес опухоли = $0,035 \pm 0,024 \text{ г}$, ТРО = $89,79\% \pm 0,024$; Rh2 – вес опухоли = $0,075 \pm 0,029 \text{ г}$, ТРО = $76,52\% \pm 0,029$.

Комбинированная терапия ДР и Rh2 приводила к ярко-выраженному взаимному потенцированию их противоопухолевого действия, что выражалось в полном подавлении опухолевого роста. В группе ДР+Rh2 не наблюдалось формирования опухолевых образований ни в период наблюдения, ни на терминальной стадии эксперимента, следовательно, показатель ТРО составлял 100%.

При анализе гематологических параметров (17 день после инокуляции опухоли) не было выявлено достоверных различий между группами К(и), К(-) и Rh2 (таблица 6).

Таблица 6. Гематологические показатели животных разных экспериментальных групп

Группа	WBC X 10^3 кл/мл	NEU, %	LIM, %	MONO, %	EOZ, %	BAZ, %	HGB
К(и)	$4,1 \pm 0,37$	$29,1 \pm 5,4$	$54,0 \pm 4,31$	$5,7 \pm 1,41$	$4,2 \pm 1,11$	$2,2 \pm 1,52$	$148,6 \pm 2,26$
К(-)	$4,3 \pm 0,7$	$27,1 \pm 7,5$	$60,3 \pm 7,15$	$7,8 \pm 1,53$	$4,3 \pm 0,97$	$2,1 \pm 0,85$	$131,3 \pm 6,24$
ДР	$2,5 \pm 0,6^{***}$	$33,3 \pm 5,3$	$44,9 \pm 4,2^{**}$	$7,6 \pm 1,22$	$5,8 \pm 1,82$	$3,1 \pm 1,28$	$135,1 \pm 5,7$
Rh2	$3,2 \pm 0,31$	$32,8 \pm 3,6$	$50,9 \pm 4,6$	$9,7 \pm 1,59$	$5,0 \pm 1,41$	$2,7 \pm 1,23$	$144,6 \pm 6,8$
Rh2+ДР	$3,9 \pm 0,9^{##}$	$22,2 \pm 5,1$	$62,8 \pm 8,2^{##}$	$6,3 \pm 0,92$	$5,2 \pm 3,12$	$2,5 \pm 0,94$	$143,3 \pm 6,7$

Примечание: HGB – гемоглобин; WBC – общее количество лейкоцитов; Процентное соотношение основных видов лейкоцитов: LIM – лимфоциты; NEU – нейтрофилы; MONO – моноциты; EOZ – эозинофилы; BAZ – базофилы. К(и) – интактный контроль; К(-) – отрицательный контроль (без лечения); ДР – «Доксорубин_тева» (0,25 мг/кг); ДР+Rh2 – «Доксорубин-Тева» (0,25 мг/кг) + Rh2 (10 мг/кг). Результаты представлены как среднее \pm SD (при $n = 7$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{##}$, $P \leq 0,01^{###}$, в сравнении с группой ДР (тест Стьюдента).

В то же время лейкограмма для группы ДР показала, что применение этого препарата приводило к лейко- и лимфопении, что выражалось в заметном снижении общего количества лейкоцитов, а также процентного содержания лимфоцитов относительно групп К(и) и К(-). При этом в группе ДР + Rh2 иммуносупрессорное действие ДР было менее выражено, так как в крови данной группы животных концентрация лимфоцитов и лейкоцитов была значительно выше чем в группе ДР. Данный факт свидетельствуют в пользу того, что Rh2 способен стимулировать лимфоцитарное звено иммунного ответа, играющее основную роль в реализации противоопухолевого иммунитета.

В следующей серии экспериментов лечение (5 ежедневных в/б инъекций) начинали на пятый день после инокуляции опухолевых клеток (при объеме опухолевого узла $58 \pm \text{мм}^3$). Как видно из рисунка 7, в режиме монотерапии ДР и Rh2 незначительно влияли на изменение размера опухоли, относительно группы К(-). Однако применение ДР в сочетании с Rh2 приблизительно в 1,5 раза снижало интенсивность опухолевого роста, относительно группы К(-). Так, к моменту терминации эксперимента в группе К(-) средний объем опухоли достигал $633,4 \pm 7,5 \text{ мм}^3$, в группе ДР – $514,1 \pm 3,2 \text{ мм}^3$ (ТРО = 18%), в группе Rh2 – $606,6 \pm 5,03 \text{ мм}^3$ (ТРО = 5%), а в группе ДР+Rh2 – $446,5 \pm 7,4 \text{ мм}^3$ (ТРО = 32%).

Таким образом, полученные данные подтверждают наличие у Rh2 способности существенно повышать терапевтическую эффективность ДР и нивелировать его побочные эффекты, в частности иммуносупрессивное действие.

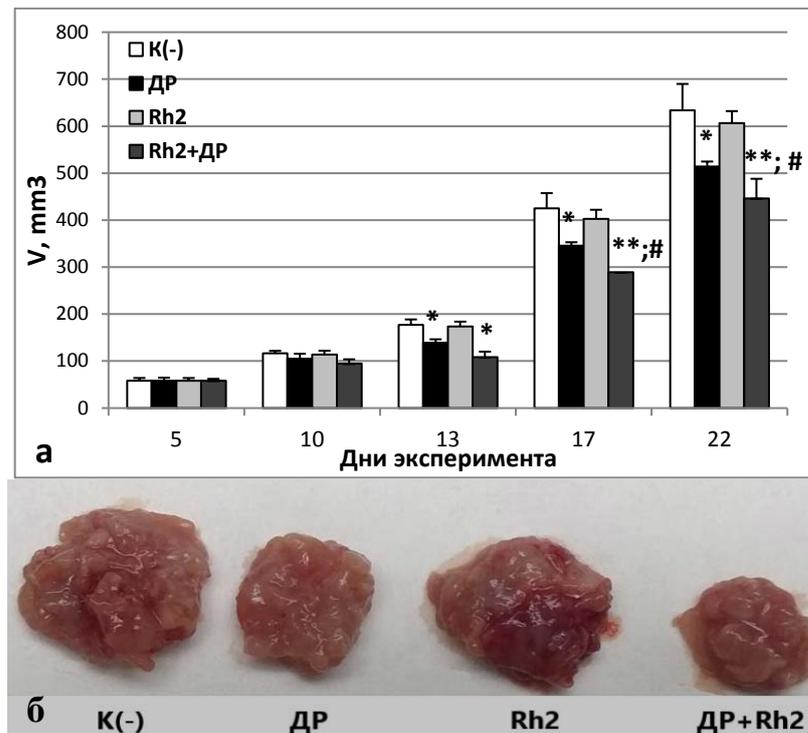


Рис. 7. Изменение объёма опухоли (а) и размер опухоли на 22 день после инокуляции опухоли (б) у разных экспериментальных групп животных: K(-) – отрицательный контроль (без лечения); DP – «Доксорубин-Тева» (0,25 мг/кг); DP+Rh2 – «Доксорубин-Тева» (0,25 мг/кг) + Rh2 (10 мг/кг). Результаты представлены как среднее \pm SD (при $n = 7$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, опытные группы в сравнении с группой K(-), $P \leq 0,05^{\#}$ в сравнении с группой DP (тест Стьюдента).

2.3.4 Исследование редокс-свойств Rh2 in vitro. В результате анализа было показано, что Rh2 проявляет себя как сильный прооксидантный агент (рис. 8).

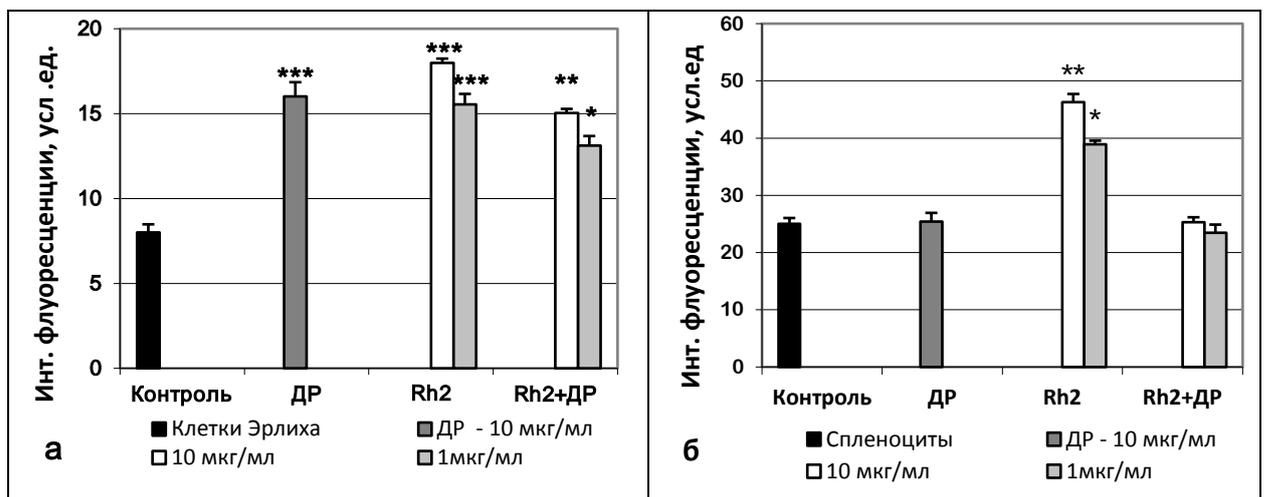


Рис. 8. Оценка влияния Rh2 на уровень АФК, отдельно и в сочетании с DP в первичных культурах опухолевых клеток аденокарциномы Эрлиха (а) и спленоцитов (б) по уровню флуоресценции $H_2DХФДА$ при 485/538 нм (ось ординат) после 3 час. инкубации. Rh2 использовали в концентрациях 1 и 10 мкг/мл. Результаты представлены как среднее \pm SD (при $n = 3$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$, в сравнении с контролем (H_2O) (тест Стьюдента).

Rh2 повышал уровень внутриклеточных АФК приблизительно в 2 раза в концентрации 10 мкг/мл и в 1,5 раза в концентрации 1 мкг/мл, как в опухолевых, так и в иммунокомпетентных клетках. В то же время DP, являющийся сильным индуктором АФК

(что считается одним из дополнительных механизмов его цитотоксического действия), проявлял прооксидантную активность только в отношении опухолевых клеток. Интересно, что ДР и Rh2 при совместном добавлении к пробам не влияли на уровень АФК в спленоцитах.

Можно предположить, что установленная для Rh2 прооксидантная активность играет важную роль в его способности оказывать противоопухолевое, иммуномодулирующее и адаптогенное действие. Поскольку известно, что АФК, в частности H_2O_2 , могут оказывать цитотоксическое и цитостатическое (запуск различных путей апоптоза и аутофагии) действие на атипичные клетки, одновременно являясь одним из факторов, повышающих активность основных звеньев гуморального и клеточного иммунного ответа. Кроме того, окислительный стресс способствует активации ключевых сигнальных путей, обеспечивающих адаптацию клеток к условиям стресса, например, Nrf2 и HIF-1 α .

2.3.5 Оценка влияния Rh2 на активность Nrf2 и HIF-1 α . Экспериментальные данные, полученные с использованием репортерных моделей, позволили оценить влияния Rh2 на универсальные сигнальные пути, которые ответственны за включение адаптационно-приспособительных программ (рис. 9).

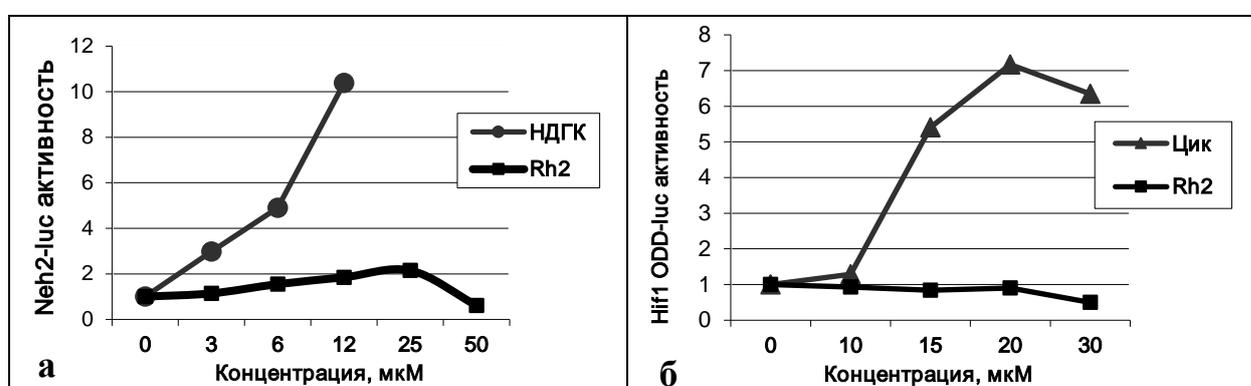


Рис. 9. Влияние Rh2 на люциферазную активность репортерных HIF ODD-luc (a) и Neh2-luc (б) конструкций. Ось ординат – интенсивность люминесценции, эквивалентная уровню активности Nrf2 и HIF-1 α . НДГК - нордигидрогваяретовой кислота, Цик – циклопирокс.

Так, при оценке активирующего действия Rh2 на Neh2-luc и HIF ODD-luc конструкции было показано, что в тест-пробах Neh2-luc, обработанных Rh2, было зарегистрировано, зависимое от концентрации, усиление люциферазной активности. Интересно, что при использовании Rh2 в концентрации 25 мкМ фиксировался максимум люминесценции, а в дозе 50 мкМ наблюдалось заметное снижение люциферазной активности. При этом Rh2 не оказывал достоверного влияния на активность конструкции HIF ODD-luc. По сравнению с эталонными активаторами модельных репортеров Neh2-luc и HIF ODD-luc, в качестве которых использовали нордигидрогваяретовой кислоту и циклопирокс, действие Rh2 было гораздо менее выраженным.

Очевидно, что молекулярный механизм адаптогенной активности Rh2 связан со стресс-зависимым характером активации Nrf2. Поскольку активная форма Nrf2, усиливая транскрипцию генов, кодирующих ферменты второй фазы детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантных ферментов, обеспечивает адаптацию клеток к окислительному стрессу и токсическому действию различных ксенобиотиков, в том числе химиотерапевтических средств. При этом отсутствие у Rh2 стимулирующего эффекта в отношении HIF ODD-luc играет скорее положительную роль. Стимулом для активации HIF-1 α в клетках является хроническая гипоксия (недостаток кислорода), а также острая гипогликемия (нехватка глюкозы). Известно, что в таких условиях прибывают клетки опухолевой ткани, находящейся на стадии прогрессивного роста, поэтому они многократно увеличивают

уровень синтеза и активность HIF-1 α , который непосредственно принимает участие в адаптации опухолевых клеток к таким критическим состояниям (Gabriely et al., 2017).

2.3.6 Предполагаемые молекулярные механизмы, терапевтического действия Rh2. Анализ литературных и представленных в настоящей работе экспериментальных данных позволил сформулировать теорию «мягкого стресса», согласно которой первичным фактором, определяющим молекулярный механизм наблюдаемого противоопухолевого, иммуностимулирующего и адаптогенного действия Rh2, является его первичная мембранотропная активность. Благодаря амфифильности и поверхностно-активным свойствам Rh2 способен напрямую взаимодействовать с липидами плазматической мембраны, тем самым изменяя структурно-функциональные характеристики клетки, а именно: 1) Нарушает избирательную проницаемость мембраны в следствие того, что молекулы Rh2 кооперируются в липидном бислое, формируя новые каналы диффузии; 2) Вызывает сдвиг редокс-баланса клетки, вероятно, за счёт образования в мембранах дополнительных каналоподобных структур, которые могут обеспечивать поступление экзогенной H₂O₂, продуцируемой ферментами семейства НАДФН-оксидаз (NOX) и супероксиддисмутазой-3 (СОД3); 3) Изменяет микровязкость липидного бислоя, в частности рафтовых структурах, что оказывает влияние на работу, содержащихся в них рецепторов, мембранных ферментов и сопряжённых с ними сигнальных белков (Likhatskaya et al., 1992; Verstraeten et al., 2018; Park et al., 2013; Popov, 2002; Popov et al., 2001; Popov et al., 1994).

Плейотропное терапевтическое действие Rh2 определяется тем, что его влияние на функциональное состояние опухолевых и нормальных клеток кардинально отличается. В первую очередь, это связано с тем, что мембранотропная активность Rh2 обратно пропорциональна содержанию холестерина в липидном бислое. При этом известно, что для плазматических мембран большинства злокачественных клеток характерно уменьшение микровязкости липидного бислоя, главным образом, из-за низкого содержания холестерина, с чем связывают их способность к активной пролиферации и метастазированию. Кроме того, содержание ферментов NOX на поверхности плазматических мембран опухолевых клеток, а значит и количество экзогенной H₂O₂, на порядок выше, чем у нормальных (Li et al., 2016; Verstraeten et al., 2018). Поэтому в одинаковых концентрациях Rh2 оказывает более агрессивное влияние на мембранную проницаемость, редокс-гомеостаз и функциональную активность рафтовых структур в опухолевых клетках, чем в нормальных.

Мембранотропное действие Rh2 на опухолевые клетки инициирует ряд физиологических клеточных процессов, приводящих к их преимущественной гибели (рис. 10 а):

- Рост внутриклеточных АФК и АФА до летальных для опухолевой клетки концентраций, за счёт поступления патофизиологического уровня экзогенной H₂O₂ (>100 нМ) в цитоплазму. При этом H₂O₂ и образованные в её присутствии ОН \cdot , НОСl, NO, ONOO- способствуют некротической гибели клеток, путём прямого окислительного повреждения жизненно важных макромолекул. Избыток H₂O₂ также содействуют митохондриальному и ER-стрессу, что стимулирует запуск летальных клеточных программ: аутофагии и стресс-индуцированного митохондриального пути апоптоза. Кроме того, H₂O₂ – известный активатор связанных с Tx, Gx протеин киназ (PK), повышающих экспрессию генов апоптоза (Lv et al., 2016).

- Нарушение структурно-функциональных свойств липидных рафт, что часто служит пусковым сигналом к активации мембранных рецепторов смерти: Fas, рецептор к фактору некроза опухоли (TNFR), Apo2/Apo3 и, как следствие, внешнего пути апоптоза. Кроме того, Rh2, через изменение структуры рафт, а также через избирательное связывание и ингибирование мембранного и цитоплазматического белка аннексина 2 (AnxA2), способен блокировать передачу сигнала через такие факторы транскрипции, как AP-1, Akt, STAT-3 и NF-kB, которые обеспечивают экспрессию генов, ответственных за пролиферацию, рост, инвазию, метастазирование, активацию репаративных процессов и

выживание клетки, а также ангиогенез (Yi et al., 2009; Shi et al., 2014; Li et al., 2018; Grindheim et al., 2017).

- Дополнительное поступление противоопухолевых агентов внутрь клетки (например, ДР) через дополнительные каналы диффузии в мембране, образованные Rh2. Одновременно с этим Rh2 предотвращает эксфлюс (выброс) ДР из опухолевых клеток трансмембранными переносчиками, такими как гликопротеин Р (Zhang et al., 2012). Тем самым Rh2 повышает концентрацию ДР внутри клеток, усиливая его цитотоксическое действие и предотвращая развитие лекарственной устойчивости.

Что касается нормальных клеток, в частности иммунокомпетентных, то «мягкое» мембранотропное и, связанное с ним, прооксидантное действие Rh2 модулирует протекающие в них физиологические процессы (рисунок 10 б):

- Повышает активность иммунных клеток. В силу меньшей перфорирующей активности Rh2 на плазматические мембраны нормальных клеток, внутриклеточное содержание поступившей экзогенной H_2O_2 не превышает физиологических концентраций (~1,0 – 10 нМ). При этом иммунные клетки используют H_2O_2 вместе с OH^- , $HClO$ и NO в борьбе с различными патогенами и атипичными клетками собственного организма. Кроме того, H_2O_2 может выступать в качестве ко-стимулирующей молекулы для ряда протеинкиназ (PK), которые усиливают экспрессию генов, ответственных за повышение активности основных звеньев гуморального и клеточного иммунного ответа. Например, H_2O_2 стимулирует активность PK, связанных с $Tg\alpha$ и $G\alpha$. Повышение активности H_2O_2 -зависимого катионного канала меластатина 2 (TRPM2), сильно экспрессированного в иммунных клетках, также обеспечивает поступление Ca^{2+} внутрь клеток, который повышает активность PKC и переводит в активную форму белок кальмодулин (Cam) и кальмодулин-зависимую PK (Sies, 2017; Mortadza et al., 2015).

- Ингибирует образование опухоль-ассоциированного фенотипа макрофагов – M2, которые обеспечивают защиту опухолевых клеток от иммунного надзора, блокируя активацию Т-киллеров и NK и повышая активность Т-супрессоров. Предположительно, это связано со способностью Rh2 к регуляции пуринергического рецептора P2X7, экспрессируемого во многих иммунокомпетентных клетках. При онкологических процессах опухолевые клетки выделяют во внеклеточное пространство большое количество аденозина и АТФ, которые вызывают гиперактивацию P2X7, что ингибирует эффекторные функции цитотоксических лимфоцитов и способствует образованию M2 (Li, et al., 2018; Helliwell et al., 2015). Таким образом, Rh2 препятствует аденозин-опосредованной иммуносупрессии и уклонению опухолевых клеток от иммунного надзора.

- «Мягкий» митохондриальный и ER-стресс, вызванный H_2O_2 , стимулирует работу дыхательной цепи, окислительное фосфорилирование, синтез АТФ в митохондриях и регулирует белковый фолдинг в эндоплазматическом ретикулуме.

- Содействует запуску адаптационно-приспособительных механизмов в нормальных клетках. Индуцированный Rh2 «мягкий стресс» через активацию Nrf2 позволяет повысить устойчивость клеток к неблагоприятным условиям, например, к окислительному стрессу или токсическому действию ксенобиотиков, в том числе к противоопухолевым агентам (Ge et al., 2017).

Как итог, отмеченные выше особенности мембранотропного и прооксидантного действия Rh2 позволяют ему выступать в качестве цитотоксического и цитостатического агента в отношении опухолевых клетках, и одновременно являться стимулятором активности и адаптогеном для нормальных клеток, в частности иммунокомпетентных. Данным уникальным свойством Rh2, вероятно, определяется наблюдаемый потенцирующий эффект этого гинзенозида к ДР и способность нейтрализовать некоторые побочные эффекты последнего, при проведении комбинированной терапии *in vivo*.

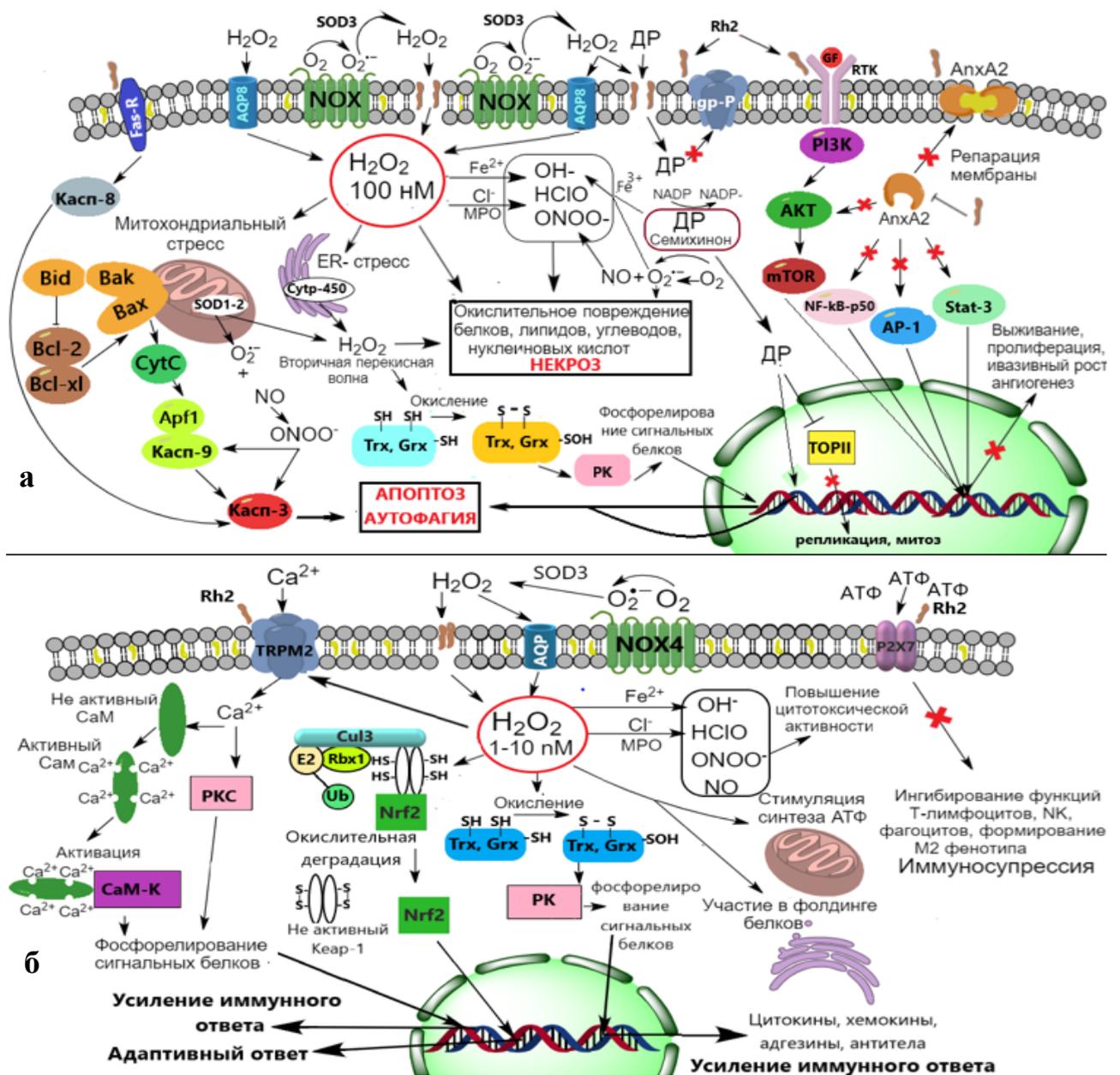


Рис. 10. Особенности мембранотропного действия Rh2 на опухолевые (а) и иммунокомпетентные (б) клетки. **Примечание:** H₂O₂, образованная при работе ферментативной системы NOX/СОД3, поступает в клетку посредством облегченной диффузии через различные аквапорины AQP (в опухолевые клетки только через специализированный AQP8), и через образованные Rh2 каналы диффузии. H₂O₂ в опухолевых клетках содействует некрозу и апоптозу с повышением активности проапоптотических белков – Bax, Bak и Bid, каспаз – 3 и 9, цитохрома С и активирующего фактора апоптотической протеазы-1 (АРАF-1) с одновременным снижением активности противоапоптотических белков – Bcl-2 и Bcl-xL. H₂O₂ через окисление тиоловых групп на редокс сенсорах, таких как тиоредоксины и глутаредоксины (Trx, Grx), активирует связанные с ними сигнальные пути, которые повышают экспрессию генов, ответственных за запуск апоптоза и аутофагии в опухолевых клетках и усиливающих иммунный ответ в иммунокомпетентных клетках. В нормальных клетках окисление тиоловых групп на супрессорном белке Keap1 ведет к распаду комплекса Nrf2-Keap1-Cul3 и активации Nrf2, что приводит к запуску внутриклеточных адаптивных программ. ДР, попадая в опухолевую клетку, оказывает цитотоксический и антимитотический эффект, путём интеркаляции между ГЦ-парами азотистых оснований цепи ДНК и взаимодействием с ДНК-топоизомеразой II, что приводит к нарушению пространственной структуры ДНК и остановке процесса репликации, предшествующей делению клетки, а также через индукцию окислительного стресса при образовании семихиноновой формы с участием ферментов группы оксидоредуктаз (P-450-редуктаза, NADH-оксидаза, NADPH-цитохром и ксантинооксидаза).

2.4 Перспективы применения СОК из морской звезды *P. pectinifera* в профилактике и лечении онкологических и воспалительных заболеваний

Оксигенированные каротиноиды (ОК), входящие в состав СОК: АК, зеаксантин и лютеин, занимают особое место среди низкомолекулярных природных соединений, которые характеризуются очень высоким потенциалом защиты организма от широкого круга заболеваний. Данные ОК рассматриваются в качестве функциональных компонентов пищи, средств профилактики онкологических, аутоиммунных, дерматологических и других заболеваний, а также действующих агентов косметических и космецевтических средств для лечения различных кожных патологий, в частности аллергических осложнений (Маока, 2011; Sathasivam and Ki, 2018; Wang et al., 2011).

2.4.1 Оценка канцерпревентивной активности СОК. При моделировании кожного канцерогенеза *in vivo* показано, что в период активного развития онкологического процесса в группах животных, прошедших профилактический курс лечения (10 мг/кг 3 раза в неделю в течение 8 недель) СОК, так же как и в группе РК, наблюдалось снижение частоты появления новых опухолевых очагов и интенсивности роста новообразований (рис. 11). Следует подчеркнуть, что в группе СОК к 11-ой неделе эксперимента образование новых опухолевых очагов на поражённом канцерогеном участке кожи практически полностью прекращалось, а к 15-й неделе размер и количество папиллом были более чем в 1,5 раза меньше, чем в группе К(-).

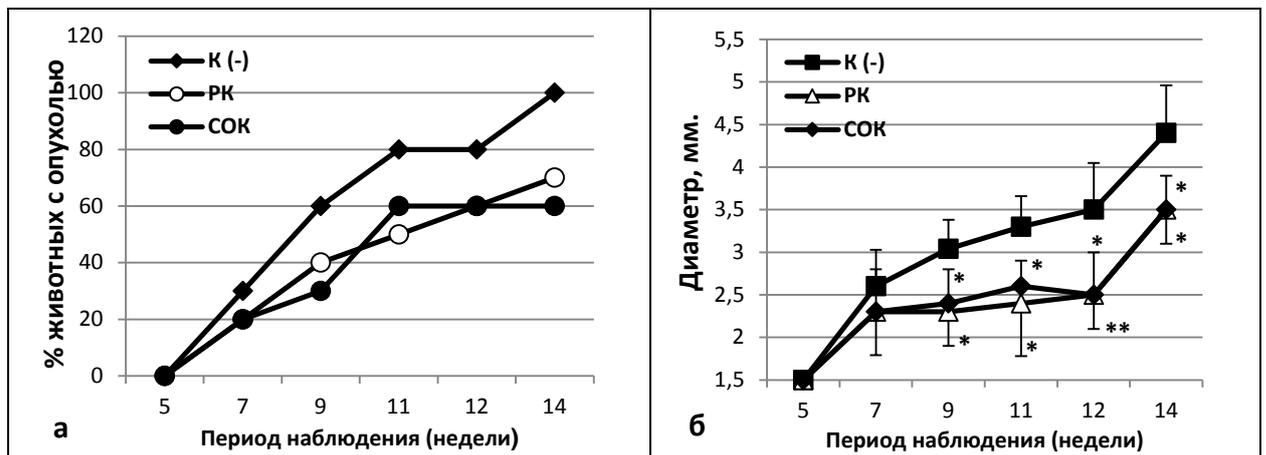


Рис. 11. Динамика частоты заболеваемости раком кожи (**а**) и изменения размера папиллом (**б**) (ось ординат) в экспериментальных группах животных: К(-) – отрицательный контроль (без лечения); РК – розмариновая кислота (положительный контроль), СОК – смесь оксигенированных каротиноидов. Данные представлены с момента появления первых изменений на обработанных ДМБА участках кожи животных (через 5 недель после начала эксперимента). Результаты представлены как среднее \pm SD (при $n = 10$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой К(-) (тест Стьюдента).

При оценке функциональной активности иммунной системы экспериментальных животных было показано, что на стадии прогрессивного роста опухоли в группе К(-) наблюдалась онкозависимая иммуносупрессия, что выражалось в снижении уровня ИЛ-1, ИЛ-17, ИФН- γ , ФНО- α , как системно (сыворотка крови), так и локально (гомогенат кожи) (рис. 12 а и б). В группе животных, получавших СОК, наблюдалось усиление иммунологического надзора, что выражалось в повышении выработки всех вышеперечисленных цитокинов до уровня, близкого к интактной группе. Полученные данные свидетельствуют о способности СОК модулировать иммунологические реакции при поражениях кожи, вызванных ДМБА.

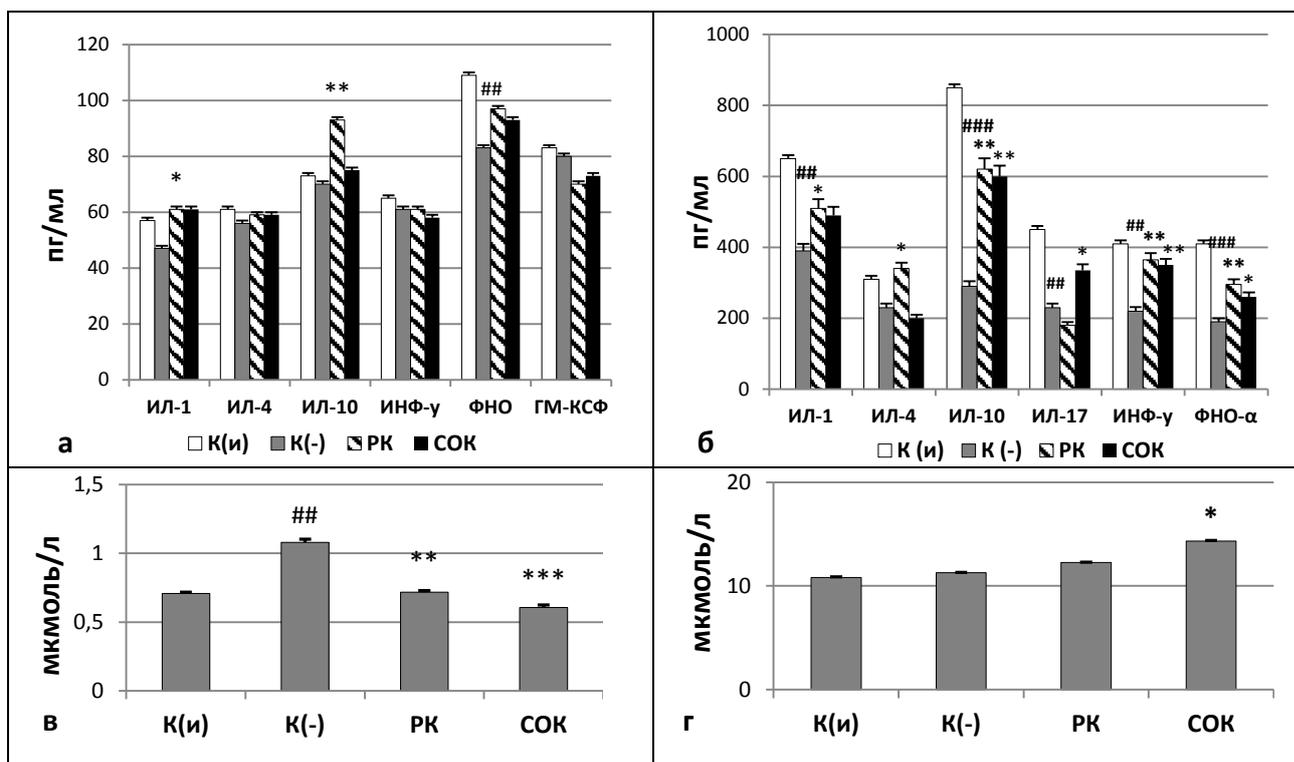


Рис. 12. Содержание цитокинов (ось ординат, Пг в 1 мл биообразца) в сыворотке крови (**а**) и гомогенате кожи (**б**), уровень МДА (**в**) и общего билирубина (**г**) (ось ординат мкмоль/л) в сыворотке крови животных при экспериментальном моделировании кожного канцерогенеза. Группы животных: К(и) – интактный контроль К(-) – отрицательный контроль (без лечения); РК – розмариновая кислота; СОК – смесь оксигенированных каротиноидов. Результаты представлены как среднее \pm SD (при $n = 10$, $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^\#$, $P \leq 0,01^{##}$, $P \leq 0,01^{###}$, группа К(-) в сравнении с группой К(и) (тест Стьюдента).

По концентрации МДА (рис. 12 в) в сыворотке крови было оценено состояния антиоксидантной системы защиты у экспериментальных животных. Показано, что в группе К(-) уровень МДА увеличивался в 1,5 раза по сравнению с группой интактных животных. СОК при этом оказалась эффективным корректором данного параметра. Анализ на общий билирубин показал, что его уровень в группах СОК и РК был в пределах нормы (рисунок 12 г). Следовательно, продолжительный приём РК и СОК не оказывали заметного токсического действия на организм животных.

Таким образом, при моделировании кожного канцерогенеза профилактический пероральный приём СОК улучшает клиническую картину течения болезни, при этом нормализуя цитокиновый профиль и уровень антиоксидантной системы в организме экспериментальных животных. Наблюдаемый канцепривентивный эффект СОК, вероятно, обусловлен высоким содержанием АК, лютеина и зексантина в её составе. Поскольку известно, что данные ОК, обладая высокой биодоступностью и способностью накапливаться в коже, способны оказывать протективное действие на эпителиальные клетки от действия различных канцерогенных факторов, а также нормализовать местный иммунологический статус кожи (Davinelli et al., 2018).

2.4.2 Оценка терапевтического действия мазевой формы СОК при АКД. В случае использования мази, содержащей в качестве активного начала 1% СОК, наблюдалось существенное уменьшение тяжести внешних патоморфологических проявлений АКД: к 4 дню лечения эритема уменьшалась приблизительно в 3 раза (рис. 13). При этом мазь СОК по эффективности терапевтического действия превосходила коммерческую мазь «Фуцидин». Кроме того, установлено, что СОК действует как эффективный корректор воспалительного процесса при АКД, тяжесть которого оценивали по уровню провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови (рис. 14).

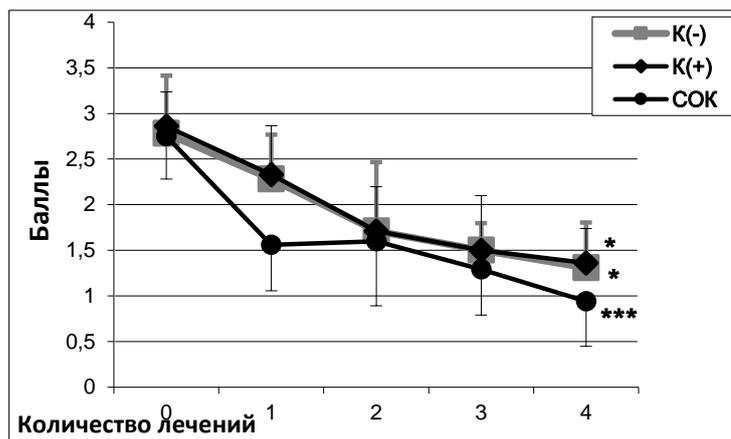


Рис. 13. Показатели выраженности эритемы в баллах от 0 до 4 (ось ординат), вызванной ДНФБ, в разных группах животных: K(-) – отрицательный контроль (без лечения); K(+)
– положительный контроль «Фуцидин»; СОК – мазь, содержащая 1% СОК, после каждого дня лечения (ось абсцисс). Результаты представлены как среднее \pm SD (при $n = 8$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{***}$ (парный тест Стьюдента).

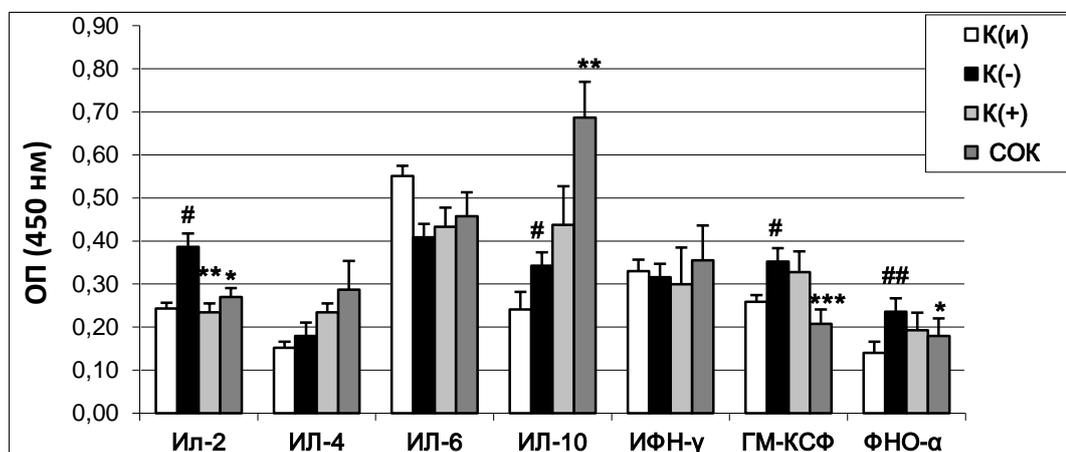


Рис. 14. Содержание цитокинов при экспериментальном моделировании АКД, вызванном ДНФБ. Образцы крови были получены через 24 часа после последней аппликации мазей. Ось ординат – оптическая плотность при 450 нм, отражающая уровень цитокинов в сыворотке крови разных групп животных: K(и) – интактный контроль; K(-) – отрицательный контроль (без лечения); K(+)
– положительный контроль «Фуцидин»; СОК – мазь, содержащая 1% смеси оксигенированных каротиноидов. Результаты представлены как среднее \pm SD (при $n = 8$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой K(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#\#}$, группа K(-) в сравнении с группой K(и) (тест Стьюдента).

Показано, что применение СОК приводило к снижению уровня основных провоспалительных цитокинов, участвующих в патогенезе АКД: ИЛ-2, ФНО- α и ГМ-КСФ, при одновременном резком увеличении содержания основных противовоспалительных цитокинов, ИЛ-10 и ИЛ-4. Данный факт может свидетельствовать о способности компонентов СОК усиливать противовоспалительный ответ при АКД.

2.4.3 Противовоспалительная активность СОК при моделировании СВ. При введении экспериментальным животным ЛПС зарегистрировано повышение сывороточного содержания провоспалительных цитокинов в группе K(-), а именно ИЛ-1, -6, ИФН- γ и ФНО- α (рисунок 15 а). Весьма характерно, что влияние СОК и препарата сравнения «Офтан-Дексаметазон» на уровень цитокинов в значительной степени зависело от их дозы и маршрута введения. При пероральном способе введения СОК стимулировала повышение уровня всех тестируемых цитокинов по сравнению с группой K(и) и K(-). Однако при внутрибрюшинном введении СОК эффективнее, чем «Офтан-Дексаметазон»,

способствовал подавлению выработки ключевых провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 и ФНО- α , доводя их содержание до уровня интактных животных.

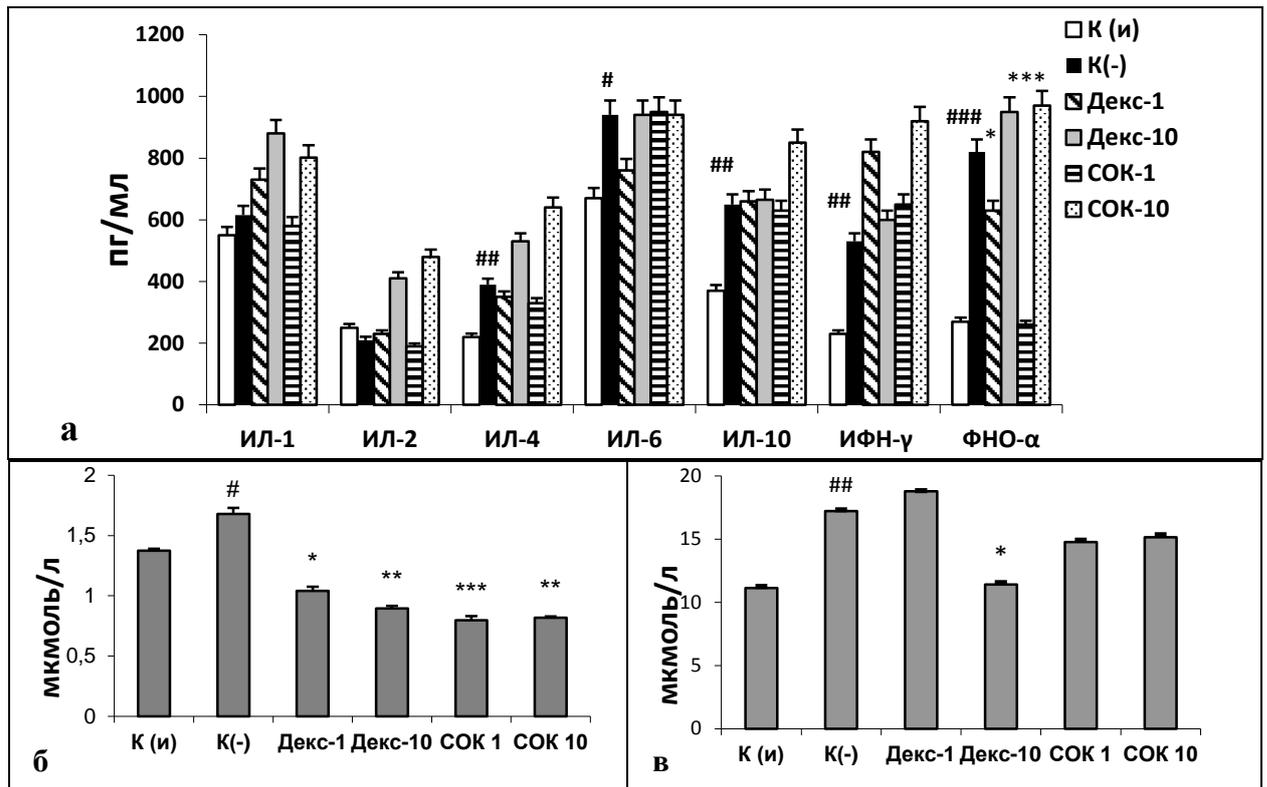


Рис. 15. Содержание цитокинов (**а**) (ось ординат, в пг/мл), МДА (**б**) общего и билирубина (**в**) (ось ординат, в мкмоль/л) в сыворотке крови животных разных экспериментальных групп: К(и) – интактный контроль; К(-) – отрицательный контроль (без лечения); Декс-1, Декс-10 – «Офтан-Дексаметазон» в дозах 1 и 10 мг/кг, соответственно; СОК-1, СОК-10 – смесь оксигенированных каротиноидов в дозах 1 и 10 мг/кг, соответственно. Результаты представлены как среднее \pm SD (при $n = 6$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#\#}$, группа К(-) в сравнении с группой К(и) (тест Стьюдента).

Необходимо отметить, что в условиях СВ, независимо от дозы и маршрута введения, СОК оказывала защитное действие на редокс-гомеостаз, и общее состояние организма, что было проанализировано по содержанию МДА и общего билирубина в сыворотке крови в разных экспериментальных группах (рис. 15 б, в). СОК при всех способах применения и дозах являлась эффективным корректором уровня МДА и общего билирубина.

Следовательно, можно предположить, что протективная активность СОК при онкологических, аллергических и воспалительных процессах определяется способностью, входящих в её состав ОК модулировать иммунный ответ и поддерживать редокс-гомеостаз организма. При этом, результаты, касаемые влияния СОК на иммунологический статус организма при различных патологиях, свидетельствуют в пользу того, что СОК проявляет себя в качестве местного, но не перорального противовоспалительного средства. А именно, СОК снижает чрезмерную иммунную реакцию при непосредственном действии на очаг воспаления (в/б введение при СВ, аппликации на воспалённый участок кожи при АКД), и в то же время оказывает иммуностимулирующий эффект при энтеральных способах введения (пероральный приём при кожном канцерогенезе и СВ). Следовательно, выбранный способ применения средств на основе СОК во многом определяет их физиологическое действие на организм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты указывают на наличие высокого терапевтического потенциала у каждого из исследованных соединений и специфических особенностей в механизмах их фармакологического действия. Приведённые данные свидетельствуют о способности мазевого препарата «Коурохитин», содержащего 0,01% ТР, выступать в качестве универсального дерматопротекторного средства, обладающего выраженными противовоспалительными, противоаллергическими и ранозаживляющими свойствами. МТ, как водорастворимое производное ТР, обладает не только цитотоксической активностью в отношении различных опухолевых клеток *in vitro*, но и повышает противоопухолевый эффект ДР при их сочетанном применении *in vivo*. Таким образом, МТ расширяет арсенал фармацевтических средств, обладающих противоопухолевым действием. Применение Rh2 в качестве средства комбинированной терапии с противоопухолевым препаратом ДР позволяет повысить эффективность химиотерапевтического курса, снизить риск развития опухолевой резистентности и нивелировать побочные эффекты химиотерапии. При этом очевидно, что отмеченные выше особенности мембранотропного действия Rh2 определяют молекулярные механизмы его противоопухолевой, иммуномодулирующей и адаптогенной активности. Результатом мембранотропного и связанного с ним прооксидантного действия Rh2 является индукция гибели опухолевых клеток по механизмам некроза, апоптоза и аутофагии при одновременной стимуляции в нормальных, в частности в иммунных, клетках запуска адаптивных программ, через стресс-индуцированную активацию сигнального пути Nrf2. Регулярное употребление СОК в качестве функциональных элементов пищи способно предупредить неблагоприятное воздействие канцерогенных факторов и снизить риск заболеваемости онкологическими патологиями. Кроме того, СОК может использоваться как эффективное средство наружного применения для лечения аллергических дерматозов и улучшения состояния кожных покровов.

ВЫВОДЫ

1. При экспериментальном моделировании различных патологий человека было определено, что изученные лечебные средства на основе ТР, МТ, Rh2 и СОК обладают высоким терапевтическим потенциалом, разным спектром фармакологической активности и специфическими особенностями в механизмах действия.
2. Показано, что экспериментальный мазевой препарат «Коурохитин», разработанный на основе ТР, является перспективным дерматопротекторным средством с ранозаживляющим и противоаллергическим действием. Терапевтический эффект препарата «Коурохитин» во многом определяется выраженной противовоспалительной активностью ТР, тесно связанной с его ингибирующим действием на синтез провоспалительных цитокинов.
3. Установлено, что терапевтический эффект МТ – нового водорастворимого и менее токсичного производного ТР, направлен в сторону противоопухолевого действия. МТ оказывает выраженное антипролиферативное действие на опухолевые клетки *in vitro* и повышает противоопухолевую эффективность ДР при их совместном применении *in vivo*.
4. Определенно, что гинзенозид Rh2 обладает высоким химиотерапевтическим потенциалом. Комбинированная противоопухолевая терапия ДР и Rh2 значительно эффективнее, чем монотерапия ДР, что свидетельствует в пользу взаимного потенцирующего действия данных препаратов. При этом Rh2, за счёт иммуномодулирующей и адаптогенной активности, способен обеспечить защиту организма от токсичных побочных действий ДР.
5. При экспериментальном моделировании кожного канцерогенеза, СВ и АКД препараты на основе СОК проявляют себя как эффективные корректоры клинических симптомов указанных патологий, способствует поддержанию оптимального баланса уровней про- и противовоспалительных цитокинов, а также редокс-гомеостаза в организме экспериментальных животных.

Список основных публикаций по теме диссертации

Статьи в журналах

1. Попов А. М., Кривошапка О. Н., Цыбульский А. В., Штода Ю. П., Климович А. А., Шнайдер К. Д., Артюков А. А. Оценка лечебной активности различных природных соединений при моделировании аллергического контактного дерматита // Биофармацевтический журнал. 2014. Т. 6, № 5. С. 3–10.
2. Попов А.М., Осипов А.Н., Корепанова Е.А., Кривошапка О.Н., Штода Ю.П., Климович А.А. Изучение антиоксидантной и мембранотропной активности хинозалинового алкалоида триптантрина с использованием различных модельных систем // Биофизика. 2015. Т. 60, № 4. С. 700–707.
3. Попов А.М., Кривошапка О.Н., Цыбульский А.В., Штода Ю.П., Климович А.А., Гафуров Ю.М., Артюков, А.А. Лечебная активность препарата «Коурохитин» при моделировании аллергического дерматита // Биофармацевтический журнал. 2015. Т. 7, № 3. С. 24–30.
4. Попов А.М., Кривошапка О.Н., Климович А.А., Артюков А.А. Биологическая активность и механизмы лечебного действия розмариновой кислоты, лютеолина и его сульфатированных производных // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62, Вып. 1. С. 22–30.
5. Klimovich A.A., Popov A.M., Krivoshapko O.N., Shtoda Y.P., Tsybulsky A.V. A comparative assessment of the effects of alkaloid tryptanthrin, rosmarinic acid, and doxorubicin on the redox status of tumor and immune cells // Biophysics. 2017. V. 62, No. 4. P. 588–594.
6. Климович А.А., Попов А.М., Стышова О.Н., Цыбульский А.В., Артюков А.А. Оценка канцерпревентивной и противовоспалительной активности смеси оксигенированных каротиноидов из морской звезды *Patiria pectinifera* // Биофармацевтический журнал. 2017. Т. 9, № 6. С. 31–39.
7. Цыбульский А.В., Попов А.М., Климович А.А., Артюков А.А., Костецкий Э.Я., Веселова М.Д. Сравнительное изучение эхинохрома А, оксигенированных каротиноидов, гинзенозида Rh₂, дисульфата лютеолина и метформина как средств потенцирования противоопухолевого действия доксорубина // Медицинская иммунология. 2018. Т. 20, № 2. С. 179–192.
8. Цыбульский А.В., Попов А.М., Костецкий Э.Я., Климович А.А., Стышова О.Н. Оценка фармакологической активности моноглюкозида Rh₂ и моногалактозилдиацилглицерола при экспериментальной пневмонии // Биофармацевтический журнал. 2018. Т. 10, № 4. С. 42–52.
9. Klimovich A.A., Popov A.M., Styshova O.N., Artyukov A.A., Tsybulsky A.V. A comparative evaluation of the actions of different secondary metabolites of marine hydrobionts on the redox status of tumor and immune cells // Biophysics. 2018. V. 63, No. 5. P. 763–768.
10. Климович А.А., Попов А.М., Газарян И.Г., Стышова О.Н., Цыбульский А.В., Веселова М. Д. Особенности биологической активности гинзенозида Rh₂ и перспективы его применения в лечении онкологических заболеваний // Биофармацевтический журнал. 2019. Т. 11, № 5. С. 24–38.
11. Popov A., Klimovich A., Styshova O., Moskovkina T., Shchekotikhin A., Grammatikova N., Dezhenkova L., Kaluzhny D., Deriabin P., Gerasimenko A., Udovenko A., Stonik V. Design, synthesis and biomedical evaluation of mostotrin, a new water soluble tryptanthrin derivative // Int. J. Mol. Med. 2020. V. 46. P. 1335–1346.
12. Klimovich A.A., Styshova O.N., Popov A.M., Moskvina T.V., Tsybulsky A.V., Derunov D.A., Stonik V.A. Experimental study of therapeutic efficacy of the topical preparation “Kourochitin” in skin allergy // Letters in Drug Design and Discovery. 2020. V. 17, No. 10. P. 1237–1244.

Патенты

1. Патент РФ № 2659682С1, 2018. Средство на основе биологически активных соединений морских гидробионтов, обладающее канцерпревентивным действием и повышающее терапевтическую активность противоопухолевых антибиотиков // Артюков

А.А., Купера Е.В., Рущкова Т.А., Маханьков В.В., Глазунов В.П., Климович А.А., Попов А.М., Козловская Э.П.

2. Патент РФ № 2694058, 2019. Водорастворимое производное триптантрина, обладающее противоопухолевой, противовоспалительной и противомикробной активностью, и повышающее терапевтическую активность противоопухолевых антибиотиков / Стоник В.А., Московкина Т.В., Климович А.А., Попов А.М., Дерябин П.И., Стышова О.Н., Щекотихин А.Е., Грамматикова М.Э., Деженкова Л.Г.

3. Патент РФ № 2694059, 2019. Фармацевтическая композиция, обладающая лечебным действием при различных кожных патологиях / Климович А.А., Гафуров Ю.М., Попов А.М., Стышова О.Н., Цыбульский А.В., Московкина Т.В., Москвина Т.В., Стоник В.А.