

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ОРИГИНАЛЬНЫХ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ
БИОМЕДИЦИНСКИХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»

На правах рукописи



Журиков Руслан Владимирович

**СПЕКТР ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И МЕХАНИЗМЫ
ДЕЙСТВИЯ 2-ИЗОБУТИЛ-4,6-ДИМЕТИЛ-5-ОКСИПИРИМИДИНА**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Коваленко Лариса Петровна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Обзор производных пиримидина как фармакологически активных соединений	15
1.2 T2-воспаление	21
1.3 T2-воспаление при аллергических и аутоиммунных заболеваниях.....	23
1.4 T2-воспаление при онкологических заболеваниях	24
1.5 Меланома.....	30
1.6 Рак молочной железы.....	33
1.7 Колоректальный рак.....	37
1.8 Анемия при онкологических заболеваниях	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1 Экспериментальные животные	43
2.2 Опухолевые клеточные линии.....	43
2.3 Исследуемые вещества	44
2.4 Препараты сравнения для верификации используемых моделей.....	45
2.5 Материалы.....	46
2.6 Методы оценки противоопухолевой и антиметастатической активности соединений	48
2.6.1 Модель злокачественной перевиваемой опухоли меланомы B16 <i>in vivo</i>	48
2.6.2 Оценка противоопухолевой активности соединения в модели злокачественной перевиваемой опухоли меланомы B16 на мышцах линии C57BL/6.....	49
2.6.3 Оценка антиметастатического действия соединения в модели злокачественной перевиваемой опухоли меланомы B16	49
2.6.4 Модель злокачественной перевиваемой опухоли аденокарциномы молочной железы Ca755.....	50
2.6.5 Оценка противоопухолевой активности соединения в модели злокачественной перевиваемой опухоли аденокарциномы молочной железы Ca755	51

2.6.6	Оценка влияния соединения на гематологические показатели мышей в модели злокачественной перевиваемой опухоли аденокарциномы молочной железы Ca755	52
2.6.7	Модель злокачественной перевиваемой опухоли аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ <i>in vivo</i>	52
2.6.8	Оценка противоопухолевой активности соединения в модели злокачественной перевиваемой опухоли аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ	53
2.7	Методы оценки противовоспалительной, противоаллергической и антимуtagenной активности соединения	54
2.7.1	Системная реакция анафилаксии.....	54
2.7.2	Мультиплексное исследование цитокинов в сыворотке крови мышей, иммунизированных овалбумином на модели системной реакции анафилаксии.....	55
2.7.3	Экссудативный отек на полный адъювант Фрейнда.....	57
2.7.4	Исследование противовоспалительной, обезболивающей активности и влияния соединения на двигательную активность животных и их гематологические показатели на модели адъювантного артрита.....	58
2.7.5	Оценка генотоксичности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578).....	59
2.8	Методы исследования механизма действия.....	61
2.8.1	Определение ингибирующей активности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578) в отношении двух изоформ фермента ЦОГ-1 и ЦОГ-2	61
2.8.2	Исследование влияния 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578) на клеточный цикл Т-лимфобластной лейкемии человека (Jurkat)	62
2.9	Статистическая обработка данных	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....		64
3.1	Оценка противоопухолевой и антиметастатической активности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина.....	64

3.1.1	Исследование противоопухолевой и антиметастатической активности основания СНК-411 и соли СНК-578 и их сочетанного применения с доксорубицином на модели меланомы В16 в опытах на мышах линии С57BL/6.....	64
3.1.2	Исследование противоопухолевой активности основания СНК-411 и соли СНК-578, а также их влияния на выживаемость мышей BALB/c с аденокарциномой толстой кишки АКАТОЛ.....	69
3.1.3	Исследование противоопухолевой активности основания СНК-411 и соли СНК-578, а также их влияния на выживаемость и гематологические показатели мышей С57BL/6 с аденокарциномой молочной железы Са755.....	73
3.2	Исследование противовоспалительной, противоаллергической и антимуtagenной активности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина	79
3.2.1	Исследование противоаллергической активности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в форме основания (СНК-411) и соли (СНК-578) на модели системной реакции анафилаксии	79
3.2.2	Мультиплексное исследование концентрации цитокинов и IgE в сыворотке крови мышей на модели системной реакции анафилаксии	80
3.2.3	Изучение противовоспалительной активности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в форме основания (СНК-411) и соли (СНК-578) на модели индуцированного полным адьювантом Фрейнда отека стопы и скакательного сустава у крыс.....	82
3.2.4	Оценка противовоспалительной активности, анальгетических свойств основания СНК-411 и соли СНК-578, и их влияния на двигательную активность и гематологические показатели крыс Wistar на модели индуцированного полным адьювантом Фрейнда артрита.....	84
3.2.5	Оценка генотоксичности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578).....	94
3.3	Исследование механизмов действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина	95
3.3.1	Определение способности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578) ингибировать активность ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2	95

3.3.2 Изучение влияния 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578) в сравнении с доксорубицином на клеточный цикл Т-лимфобластной лейкемии человека (линии Jurkat)	97
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ	115
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	117
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Ввиду высокой летальности и сложности течения онкологических заболеваний поиск новых эффективных терапевтических подходов и стратегий является очень актуальным. По данным международного агентства по изучению рака (МАИР) число новых случаев онкологических заболеваний во всем мире увеличилось на 50%, а смертность от рака – примерно на 18% в период с 2012 по 2022 год. По оценкам МАИР число онкологических заболеваний продолжит расти в течение следующих 30 лет, при этом число новых случаев увеличится на 77% к 2050 году.

Методы лечения опухолей постоянно совершенствуются, появляются новые подходы. Наряду с химиотерапией, хирургическим лечением и радиотерапией в последние годы стала активно применяться иммунотерапия. В настоящее время процесс так называемого иммуноредактирования рака определяется как кооперативное взаимодействие между опухолевыми клетками и иммунной системой. Сложный патофизиологический механизм иммуноредактирования состоит из трех основных фаз: элиминация, равновесие и ускользание.

На этапе элиминации иммунная система уничтожает опухолевые клетки до того, как их можно обнаружить клинически. Если опухолевые клетки выживают, то они вступают в фазу равновесия, в которой иммунная система не может полностью элиминировать все делящиеся опухолевые клетки, но при этом не идет активный рост опухолевой массы, что может длиться годами и даже десятилетиями. Когда опухолевые клетки подвергаются генетическим мутациям или воздействию иных факторов, они переходят из фазы равновесия в фазу ускользания, в которой деление опухолевых клеток уже невозможно контролировать, к моменту постановки клинического диагноза большинство опухолей уже находятся в стадии ускользания.

После открытия ингибиторов иммунных контрольных точек (ИКТ), что привело к революции в области противоопухолевых методов лечения, в комбинированной иммунотерапии рака рассматриваются новые мишени и направления, включая неоантигены, противоопухолевые вакцины, онколитические вирусы и цитокины. Хотя комбинированная иммунотерапия является наиболее очевидным подходом, обсуждаются и новые методы иммунотерапии: преодоление

первичной и вторичной резистентности к существующим ИКТ, активация эффекторных клеток иммунитета и воздействие на иммуносупрессивные механизмы в микроокружении опухоли [154]. С накоплением опыта проведения иммунотерапии стало ясно, что данный метод также имеет свои ограничения и не является универсальным. Оказалось, что далеко не при каждом онкологическом заболевании применение ИКТ к CTLA-4 и PD-L1 приводит к желаемому результату. На пути к поиску способов преодоления резистентности опухолей к ИКТ внутри иммунотерапии развиваются новые подходы, такие как: поиск новых молекулярных мишеней, воздействие на иные популяции иммунокомпетентных клеток в опухоли, использование моноклональных антител, дендритно-клеточные противоопухолевые вакцины, адоптивная иммунотерапия. В последнее время фокус внимания исследователей постепенно смещается с непосредственного влияния на опухолевые клетки или эффекторные иммунные клетки к воздействию на опухолевое микроокружение, так как оно является важнейшим звеном развития онкологического процесса: дисбаланс иммунных сигнальных молекул (цитокинов, хемокинов) и клеточного состава в микроокружении опухоли способствует её росту, развитию и метастазированию [57].

В современной онкологии побочные эффекты остаются одной из основных проблем химиотерапии, в частности угнетение кроветворения и анемия [68]. Нарушение гемопоза приводит не только к анемии, но и к таким потенциально жизнеугрожающим состояниям как лимфопения и лейкопения. Потенциальным способом решения данной проблемы становится совместное применение цитостатиков с препаратами из других фармакологических групп как с целью снижения доз, так и протекции костного мозга.

В данных условиях актуальной становится разработка лекарственных средств, обладающих способностью нормализовать иммунный ответ организма на опухоль. Изменяя иммунологический «ландшафт» опухолевого микроокружения, данные средства потенциально могут повысить чувствительность опухолей к иммунотерапии, а также снизить дозы препаратов, необходимые для достижения терапевтического ответа, что приведет к снижению частоты побочных эффектов.

Таким образом, в условиях поиска средств для преодоления резистентности к терапии, снижения побочных эффектов и целенаправленного воздействия на

опухолевое микроокружение, особый интерес представляют соединения с комплексным механизмом действия. Как показали ранее проведенные исследования, синтезированный в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин является именно таким перспективным соединением. Его способность модулировать иммунный ответ (снижая концентрации проонкогенных интерлейкинов) в сочетании с противоопухолевым и противовоспалительным действием соответствует современным трендам разработки препаратов, направленных на нормализацию иммунологического «ландшафта» опухоли и повышение эффективности существующих методов лечения.

Степень разработанности проблемы. В настоящее время активно идут исследования с целью поиска способов влияния на опухолевое микроокружение для повышения эффективности иммунотерапии [57]. Одним из перспективных подходов является использование иммуностропных средств совместно с ИКТ. Например, на опухолевых моделях проводились исследования противоастматического препарата Tosilart (IPD), которые показали, что он ингибирует секрецию ИЛ-4 Th2-клетками, способствует переходу Th2-клеток в Th1-фенотип и вызывает торможение роста таких клеточных линий опухолей молочных желез как EO771, 4T1 и EMT6 [55]. На данный момент не зарегистрировано ни одного лекарственного средства с подобными показаниями к применению, так как данная тематика стала активно рассматриваться только после появления данных об ограниченной эффективности ИКТ.

В отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» был проведен синтез 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина как в форме плохо растворимого в воде основания, так и легко растворимой соли гидрохлорида. Запатентованы две формы соединения: СНК-411 (2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин) и СНК-578 (2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина гидрохлорид) [13, 14].

На экспериментальных моделях солидных опухолей эпидермоидной карциномы легкого Льюиса и рака шейки матки РШМ-5 было показано наличие противоопухолевых свойств у 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина и снижение под его действием концентрации проонкогенных T2 цитокинов в

сыворотке крови мышей-опухоленосителей [9, 11]. На модели общей системной анафилаксии к овальбумину у морских свинок альбиносов определена противоаллергическая активность СНК-411 и СНК-578, на других экспериментальных моделях определено иммуностропное и противовоспалительное действие 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина [8, 12].

Цель исследования. Расширенная оценка противоопухолевой, антиметастатической и противоаллергической активности и анализ механизмов действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в качестве монотерапии или при сочетанном применении с гемцитабином и доксорубицином.

Задачи исследования:

1. Провести оценку противоопухолевой и антиметастатической активности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на модели меланомы В16 в опытах на мышах линии С57BL/6, в том числе при сочетанном применении с доксорубицином.

2. Исследовать противоопухолевую активность и влияние на выживаемость 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в качестве монотерапии или при сочетанном применении с доксорубицином на модели аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ в опыте на мышах линии BALB/с.

3. Исследовать противоопухолевую активность и влияние на выживаемость и гематологические показатели 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в качестве монотерапии или при сочетанном применении с гемцитабином на модели аденокарциномы молочной железы Са755 в опытах на мышах линии С57BL/6.

4. Изучить противоаллергическую активность, в том числе влияние на уровень цитокинов и IgE в сыворотке крови, 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на модели системной реакции анафилаксии у мышей линии BALB/с.

5. Исследовать анальгетическую и противовоспалительную активность 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на модели адьювантного артрита у крыс.

6. Оценить влияние 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на активность ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2, на липооксигеназный путь воспаления для определения механизма противовоспалительного действия.

7. Изучить механизм противоопухолевого действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина по влиянию на клеточный цикл и оценить его генотоксичность.

8. Провести сравнительную оценку фармакологического спектра и эффективных доз основной и солевой форм 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина.

Научная новизна. Противоопухолевая и антиметастатическая активность 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина была подтверждена на трех моделях солидных опухолей. Впервые на модели меланомы В16 выявлено, что индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) при 14-ти дневном внутрибрюшинном (в/б) введении основания СНК-411 в дозе 10 мг/кг составил 72%, при в/б введении в дозе 25 мг/кг – 82,9%. ИИМ при 14-тидневном в/б введении соли СНК-578 в дозе 10 мг/кг составил 75,8%, а в дозе 25 мг/кг – 92,3%. Курсовое в/б введение основания СНК-411, соли СНК-578 в сочетании с однократным введением доксорубицина вызывало выраженное антиметастатическое действие (СНК-411+доксорубицин - ИИМ-92,3); (СНК-578+доксорубицин - ИИМ-98,9%).

Впервые на модели аденокарциномы молочной железы Са755 было определено, что при курсовом в/б введении основания СНК-411 в дозе 25 мг/кг с двукратным введением гемцитабина торможение роста опухоли (ТРО) составило 79%. При курсовом в/б введении соли СНК-578 в дозе 10 мг/кг совместно с двукратным введением гемцитабина ТРО составило 80%. Также на данной модели было показано, что введение 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина предотвращало развитие анемии у мышей с аденокарциномой Са755.

Впервые на модели аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ было показано, что при 14-ти дневном пероральном введении основания СНК-411 в дозе 25 мг/кг на 21 день опыта ТРО составило 74%, на 28-е сутки ТРО составило 67%. При в/б введении соли СНК-578 в дозе 10 мг/кг на 21 день опыта ТРО также составило 74%, на 28-е сутки – 64%. При двукратном в/б введении доксорубицина в дозе 5 мг/кг на 21-й день опыта ТРО составило 82%, на 28 сутки – 69%, при

введении основания СНК-411 в дозе 25 мг/кг ТРО составило 67%. Ингибирование роста опухоли при совместном введении основания СНК-411 в дозе 25 мг/кг и доксорубицина в дозе 5 мг/кг 92,7%, а при введении доксорубицина совместно с солью СНК-578 в дозе 10 мг/кг ТРО 91,6%.

Впервые было обнаружено, что 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин реализует свой противоаллергический эффект и уменьшает гибель от анафилаксии за счет снижения в крови уровня проаллергенных Т2 интерлейкинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13) и иммуноглобулина Е (IgE) у сенсибилизированных к овальбумину мышей.

На модели адьювантного артрита впервые были выявлены анальгетические свойства 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина. Соединение восстанавливало двигательную активность животных, уменьшало воспаление в пораженных конечностях на ранних сроках наблюдения, увеличивало концентрацию гемоглобина в крови животных.

Впервые показано, что 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин является неселективным ингибитором ЦОГ. На модели ПАФ-индуцированного отека у крыс показано, что 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин влияет на липооксигеназный путь воспаления.

На клетках линии Jurkat было впервые установлено, что соль СНК-578 в концентрации 10^{-4} М уменьшает долю клеток в S фазе клеточного цикла и увеличивает долю клеток в G₁ фазе клеточного цикла, показано, что изучаемое соединение не обладает генотоксичностью.

Теоретическая и практическая значимость работы. Расширено представление о спектре фармакологической активности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина. На трех опухолевых моделях выявлено антиметастатическое, противоопухолевое и гематопротекторное действие 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина. На модели системной анафилаксии показано, что 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин обладает противоаллергическим действием, обусловленным снижением концентрации IgE и Т2-цитокинов. Изучены отдельные механизмы противоаллергического, противовоспалительного и противоопухолевого действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина, показано, что он не обладает генотоксичностью. Проведено сравнение фармакологической активности и эффективных доз 2-изобутил-4,6-диметил-5-

оксипиримидина в виде основания (СНК-411) и соли (СНК-578). Полученные данные обуславливают перспективность дальнейшего доклинического изучения механизмов действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578), а также изучения сочетанного применения СНК-578 с лекарственными средствами, использующимися в лечении онкологических заболеваний. Результаты доклинического изучения фармакологического спектра и механизмов действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина указывают на возможность получения разрешения на проведение 1-ой фазы клинических испытаний.

Методология и методы исследования. Для изучения спектра фармакологической активности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина был использован комплекс экспериментальных моделей *in vivo* и *in vitro*. Оценка противоопухолевой активности на трех моделях солидных опухолей: меланомы В16, аденокарцинома толстой кишки АКАТОЛ и аденокарцинома молочной железы Са755. Рассчитывалось торможение роста опухоли, индекс ингибирования метастазирования, а также проводился анализ выживаемости по методу Каплана–Мейера. Противовоспалительные и иммуностропные свойства соединения оценивали на модели системной анафилаксии, индуцированной овальбумином, ПАФ-индуцированного экссудативного отека и адьювантного артрита. Рассчитывали индекс реакции анафилаксии, выполняли общий анализ крови, а также проводили цитометрическое определение концентрации цитокинов и серию специфических тестов для оценки противовоспалительной активности. Генотоксические свойства соединения исследовали методом учета хромосомных aberrаций. Для выяснения механизмов действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина оценивали его влияние на активность циклооксигеназ (ЦОГ-1 и ЦОГ-2), а также с помощью проточной цитометрии изучали его воздействие на клеточный цикл *in vitro* на модели клеточной линии Jurkat.

Положения, выносимые на защиту:

1. Противоопухолевая и антиметастатическая активность 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на модели меланомы В16 в опытах на мышах линии С57BL/6, в том числе при сочетанном применении с доксорубицином.
2. Противоопухолевая активность и влияние на выживаемость 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в качестве монотерапии или при сочетанном

применении с доксорубицином на модели аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ в опыте на мышах линии BALB/c.

3. Противоопухолевая активность и влияние на выживаемость и гематологические показатели 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в качестве монотерапии или при сочетанном применении с гемцитабином на модели аденокарциномы молочной железы Ca755 в опытах на мышах линии C57BL/6.

4. Противоаллергическая активность, в том числе влияние на уровень цитокинов и IgE в сыворотке крови, 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на модели системной реакции анафилаксии у мышей линии BALB/c.

5. Анальгетическая и противовоспалительная активность 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на модели адьювантного артрита у крыс.

6. Влияние 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на активность ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2, на липооксигеназный путь воспаления.

7. Влияние 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на клеточный цикл и оценка его генотоксичности.

8. Сравнительная оценка фармакологического спектра и эффективных доз основной и солевой форм 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина.

Степень достоверности. Достоверность результатов всех исследований подтверждается адекватными методами статистического анализа и повторами серий опытов. Статистическая обработка полученных данных была проведена с привлечением соответствующих современных методов математической статистики.

Апробация результатов. Результаты диссертационной работы доложены на Всероссийской научной конференции молодых ученых «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2018), на VI съезде фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи – новые лекарства» (Клязьма, 2023), Всероссийской научно-практической конференции «Достижения и перспективы экспериментальной фармакологии в онкологии и радиационной медицине» (Обнинск, 2024), 12-ой Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств и клинических испытаний медицинских изделий» (Санкт-Петербург, 2025).

Личный вклад автора состоит в выполнении экспериментальной и аналитической части диссертации, автором проведена обработка и интерпретация полученных данных. При участии автора также были подготовлены публикации по результатам диссертационной работы.

Публикации по теме работы. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 6 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России, и 5 тезисов в материалах научных съездов и конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 140 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей материалы и методы исследования, главы, содержащей результаты экспериментов, главы, содержащей обсуждение результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 27 таблицами и 13 рисунками. Список литературы содержит 207 источников, в том числе 27 отечественных и 180 зарубежных источников.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Обзор производных пиримидина как фармакологически активных соединений

Производные пиримидина представляют собой обширный класс органических соединений, которые содержат в своей структуре шестичленный гетероцикл с двумя атомами азота в положениях 1 и 3 (рисунок 1). Вещества данной группы обладают широким спектром фармакологической активности, что позволяет рассматривать ядро пиримидина в качестве перспективного скаффолда для разработки новых биологически активных соединений [185].

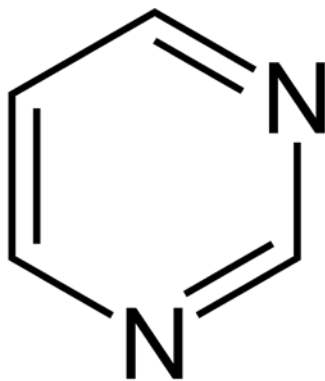


Рисунок 1 – Структурная формула пиримидина [26]

В человеческом организме пиримидины входят в состав рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Синтез пиримидинов осуществляется в шесть стадий из бикарбоната и глутамин с клеточной компартиментализацией отдельных стадий в цитозоле или митохондриях, что позволяет изменять скорость метаболизма в соответствии с потребностью организма [21].

Производные пиримидина обладают широким спектром фармакологических эффектов. Помимо прямого противовоспалительного, противовирусного и противоопухолевого действия, они также способствуют репарации, активации иммунитета и стимуляции кроветворения. Производные пиримидина нашли свое применение в лечении инфекционных, хирургических, неврологических, онкологических и многих других заболеваний и представляют собой группу самых разнообразных химических веществ с широким спектром фармакологической активности [26].

Оротовая кислота, метилурацил и пентоксил относятся к производным пиримидина, которые обладают репаративными и иммуностропными свойствами. Действие метилурацила (рисунок 2) реализуется по нескольким направлениям: он ингибирует фермент уридинфосфатазу (как и пентоксил), что приводит к накоплению дезокситимидинмонофосфата (dTMP) и, как следствие, к ускорению синтеза ДНК и клеточного деления, также препарат индуцирует синтез интерферонов и антител плазматическими клетками, увеличивает количество лимфоцитов. Фагоцитоз-стимулирующий эффект опосредован его способностью повышать активность ключевых ферментов энергетического метаболизма – сукцинатдегидрогеназы и изоформ альфа-глицерофосфатдегидрогеназы (α -ГФДГ). Оротовая кислота, в отличие от метилурацила, действует как прямой метаболический предшественник. Она способствует накоплению пиримидиновых оснований в клетке, облегчая биосинтез ДНК, РНК и пролиферацию клеток [6].

Эндогенные пиримидины и их синтетические аналоги обладают антистрессорными и психостимулирующими свойствами, являются эффективными средствами лекарственной профилактики стресса [7].

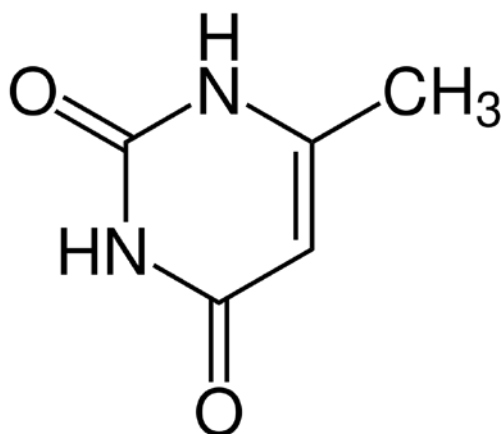


Рисунок 2 – Структурная формула Метилурацила [6]

Цитарабин (4-Амино-1-бета-D-арабинофуранозил-2(1H)-пиримидинон) – антагонист пиримидина, цитостатический препарат из группы антиметаболитов-аналогов цитидина (рисунок 3). Его метаболит – цитарабинтрифосфат ингибирует ДНК-полимеразу [26].

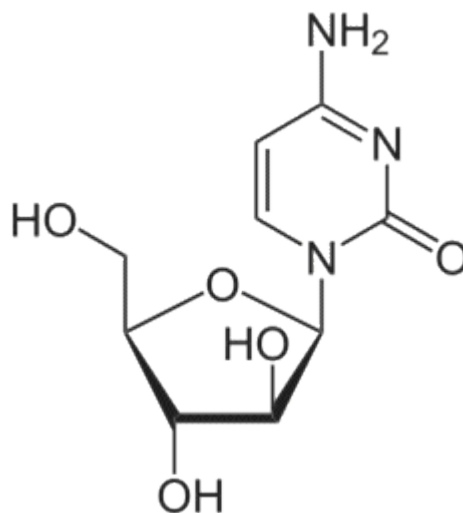


Рисунок 3 – Структурная формула Цитарабина [26]

Зидовудин и Ламивудин (рисунок 4) являются антиретровирусными препаратами. Метаболиты этих препаратов за счет ингибирования активности обратной транскриптазы нарушают репликацию ДНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [58].

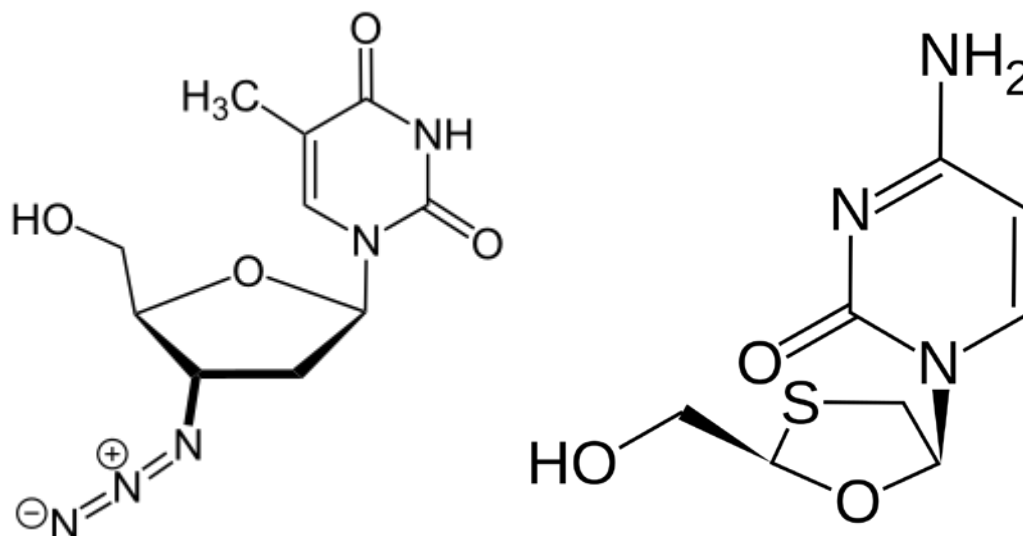


Рисунок 4 – Структурные формулы Зидовудина (слева) и Ламивудина (справа) [58]

Способность Трифлуридина (рисунок 5) ингибировать тимидилатсинтазу позволила эффективно использовать его в комбинации с Типирацилом при лечении пациентов с метастатическим колоректальным раком, которым уже проводилась или не показана стандартная химиотерапия на основе фторпиримидина, оксалиплатина и иринотекана, а также терапия моноклональными антителами к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF) и к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) [21].

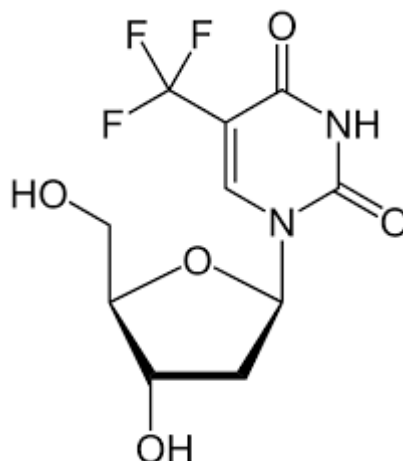


Рисунок 5 – Структурная формула Трифлуридина [21]

Фторпиримидины – группа противоопухолевых цитостатиков. Ключевой механизм их действия заключается в том, что структурные аналоги пиримидиновых оснований в опухолевых клетках превращаются в активные метаболиты. Эти метаболиты ингибируют ферменты, критически важные для синтеза нуклеиновых кислот: тимидилатсинтетазу (фторурацил и его аналоги, ралтитрексид), ДНК-полимеразу (цитарабин) и рибонуклеотидредуктазу (гидроксикарбамид) [45, 76].

Классическим примером служит фторафур (тегафур) – это пролекарство, высвобождающее 5-фторурацил *in vivo* (рисунок 6). Перспективность его перорального применения для длительной терапии привлекла внимание японских фармацевтических компаний, особенно в контексте высокой распространённости опухолей желудочно-кишечного тракта [5]. В клинической практике получили распространение как сам фторафур, так и его комбинации, направленные на усиление и пролонгацию действия:

УФТ (Тевафур + Урацил): урацил конкурентно ингибирует катаболизм 5-ФУ, повышая его концентрацию в опухоли.

S1 (Тегифур): комбинация тегафура с двумя модуляторами – гимерацилом (ингибитором дигидропиримидиндегидрогеназы, DPD) и отерацилом (оксонатом калия, снижающим желудочно-кишечную токсичность).

Капецитабин (Кселода): оральное пролекарство 5-ФУ, которое селективно активируется в опухолевой ткани, минимизируя системную токсичность [2].

Таким образом, от базового фторафура перешли к созданию таргетированных комбинаций и пролекарств, что повысило эффективность и безопасность терапии

фторпиримидинами при онкологических заболеваниях, особенно желудочно-кишечного тракта.

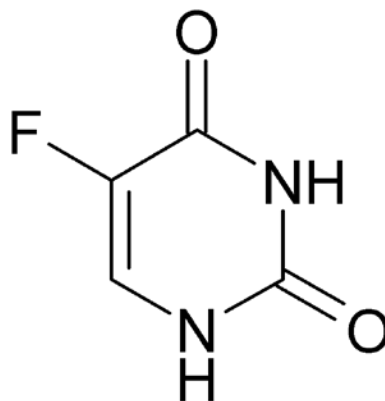


Рисунок 6 – Структурная формула Фторурацила [5]

Пиразоло[1,5-а]пиримидин представляет собой ключевой азотсодержащий гетероциклический фрагмент (скаффолд) с широким спектром биологической активности. Его структура образуется конденсацией двух важных моноциклов – пиразола и пиримидина, формируя жёсткую плоскую бициклическую систему (рисунок 7) [34]. Каждый из этих моноциклов сам по себе является фундаментальным фармакофором. Пиримидин – диазиновый гетероцикл, лежащий в основе нуклеотидов, нуклеиновых кислот, витаминов (группы В), коферментов и пуринов [127]. Пиразол – широко используется в дизайне лекарств как фрагмент для создания противовоспалительных, противовирусных, противоопухолевых, антикоагулянтных и антидепрессивных препаратов [90, 139]. Объединение этих двух активных фрагментов в единую пиразоло[1,5-а]пиримидиновую структуру приводит к синергии свойств, что делает данный скаффолд чрезвычайно перспективной основой для разработки новых лекарственных средств. Соединения на его основе демонстрируют противоопухолевую, противовоспалительную, антибактериальную и противовирусную активность [36, 37, 62, 67, 89, 202], подтверждая его статус одного из ключевых фрагментов в современной медицинской химии [4, 18].

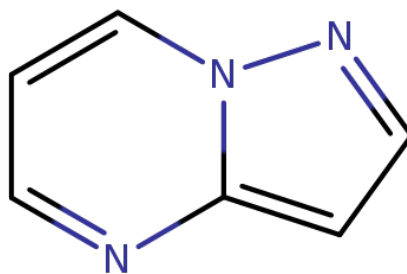


Рисунок 7 – Структурная формула пиразоло[1,5-а]пиримидина [34]

Согласно данным Almansa С. с соавторами, 2001, синтез и изучение противовоспалительных свойств ряда производных пиразоло[1,5-а]пиримидина помогли выявить соединение, включающее метилпиразолпиримидин, продемонстрировавшее сильное и селективное ингибирование ЦОГ-2 [32].

Frey R.R. и соавт. изучали 7-аминопиразоло[1,5-а]пиримидины как ингибиторы рецепторных тирозинкиназ – перспективной мишени для создания противоопухолевых средств, учитывая их ключевую роль в регуляции клеточных процессов и развитии злокачественных опухолей. [75].

В 2020 году Yang X.Z с соавторами предложили оригинальное применение производных пиразоло[1,5-а]пиримидина: они получили производные нескольких традиционных флуоресцентных биомаркеров на основе пиримидинов и определили возможность различать опухолевые и нормальные клетки по средним значениям интенсивности флуоресценции [199].

Производные пиразол[1,5-а]пиримидина были исследованы в качестве противоопухолевых соединений, блокирующих пролиферацию опухолевых клеток [100]. Одним из примеров является дорсоморфин, ингибитор АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК). Активация АМФК (АМР-активируемой протеинкиназы) способствует адаптации опухолевых клеток к условиям метаболического стресса, повышая их выживаемость. Это обстоятельство делает ингибиторы данного фермента перспективными терапевтическими агентами в онкологии [91]. Так, в работе Liu X. с соавт. показано, что производное пиразоло[1,5-а]пиримидина дорсоморфин проявляет выраженную противоопухолевую активность в отношении глиомы. *In vitro* препарат достоверно снижает жизнеспособность опухолевых

клеток, комбинируя ингибирование пролиферации с индукцией гибели через несколько взаимодополняющих механизмов. К ним относятся: подавление сигнальных путей АКТ и mTORC1/C2, активация протеолитического каскада кальпаин/катепсин, остановка клеточного цикла в фазе G₂/M, а также инициация некроптоза и аутофагии. [122].

1.2 T2-воспаление

Хроническое воспаление вызывает нарушение иммунологического гомеостаза, при котором ряд цитокинов участвуют во многих иммунопатологических процессах при онкологических заболеваниях и аллергии, в частности плейотропный интерлейкин ИЛ-4 [73, 177]. По данным Всемирной организации здравоохранения, из-за загрязнения окружающей среды, появления новых аллергенов аллергией страдает до 35% мирового населения и показатели заболеваемости растут. Так, число больных астмой составляет около 300 млн человек. По данным Европейской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов (ЕААСИ) хроническими аллергическими заболеваниями болеют до 150 млн европейцев, а в 2025 году это будет уже половина Европы. От аутоиммунных заболеваний страдает около 8% населения земного шара. Несмотря на высокую распространенность, аллергию обычно недостаточно диагностируют и лечат.

T2-воспаление – это совокупность воспалительных процессов, протекающих под действием цитокинов, секретируемых хелперами второго типа (Th2-клетками), лимфоидными клетками врожденного иммунитета 2-го типа (ILC-2), базофилами, тучными клетками. К этим цитокинам относятся ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-33 и т.д. Основная направленность иммунной реакции второго типа – это защита от паразитов, ядов и токсинов, а также заживление ран [112]. T2-иммунный ответ преимущественно локализуется в эпителиальных тканях и слизистых оболочках.

Воспалительные реакции начинаются с секреции аларминов – особых молекул, инициирующих иммунный ответ. К T2 аларминам относятся тимусный стромальный лимфопоэтин (ТСЛП), ИЛ-25 и ИЛ-33. Данные алармины секретируются клетками разных типов, такими как: кератиноциты, эпителиальные

клетки, стромальные клетки, тучные клетки, базофилы и дендритные клетки (ДК) в ответ на повреждающее воздействие. Алармины, секретируемые эпителиальными клетками, в свою очередь активируют резидентные тканевые ДК, которые способствуют дифференциации наивных CD4⁺-лимфоцитов в аллерген-специфические Th2 или в фолликулярные Т-хелперы (Tfh) в дренажных лимфоузлах, а также привлечению ILC-2. Th2-клетки, Tfh и ILC-2 активно секретируют ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13.

Интерлейкин-4 – плеiotропный цитокин, регулирующий клеточный и гуморальный иммунный ответ, участвующий в процессах пролиферации, дифференцировки и активации клеток различного типа. ИЛ-4 секретируется активированными Т-лимфоцитами, тучными клетками, ДК, НКТ-клетками, базофилами, эозинофилами. В В-лимфоцитах запуск каскада фосфорилирования по пути ИЛ-4R/STAT6 индуцирует экспрессию генов, вовлеченных в В-клеточную дифференцировку и переключение синтеза изотипов иммуноглобулинов на IgE, IgG1 и IgA. Димеризованные комплексы STAT6 транслоцируются в ядро и инициируют транскрипцию. ИЛ-4/STAT6 сигнальный каскад играет существенную роль в стабилизации Th2 фенотипа и ингибировании дифференцировки по Th1 пути. ИЛ-13 – плеiotропный цитокин, схожий по своим физиологическим функциям с ИЛ-4 [132].

ИЛ-5 – провоспалительный цитокин, регулирующий дифференциацию, созревание, активацию и ингибирование апоптоза эозинофилов. Основными источниками ИЛ-5 являются Th2-клетки, ILC-2, сами эозинофилы и натуральные киллеры [156]. ИЛ-5 стимулирует дегрануляцию эозинофилов и инфильтрацию ими стенки бронхов при эозинофильной астме, что делает его одним из ключевых звеньев патогенеза данного заболевания. ИЛ-5 и ИЛ-9 привлекают в очаг воспаления тучные клетки и эозинофилы.

IgE – класс антител, отвечающий за защиту от паразитов и ядов. Данный иммуноглобулин вырабатывается В-клетками, после того как им был презентируван антиген, и они были активированы с помощью ИЛ-4. Ключевым звеном в развитии аллергического ответа является взаимодействие IgE с высокоафинным FcεRI-рецептором, присутствующим на тучных клетках, базофилах, эпителии респираторного тракта и некоторых иммунных клетках [80,

113]. Связывание поливалентного аллергена с фиксированными на рецепторе молекулами IgE приводит к агрегации FcεRI, что служит сигналом для немедленной дегрануляции тучных клеток и базофилов и выброса биоактивных веществ. Под действием медиаторов T2-воспаления, простагландинов, гистамина, лейкотриенов, триптазы развиваются все характерные для аллергии симптомы: отек, вазодилатация, выделение слизи, зуд, бронхоконстрикция.

Важной функцией T2-воспаления является поддержание целостности эпителиальных барьеров, что определяется его ведущей ролью в ремоделировании тканей после повреждения. На завершающих этапах воспаления M2 макрофаги играют решающую роль в завершении воспаления и заживлении тканей [187].

При длительном течении T2-воспаления в тканях развивается фиброз, что в зависимости от локализации может приводить к сужению анатомических просветов органов, например, стеноз пищевода при эозинофильном эзофагите.

1.3 T2-воспаление при аллергических и аутоиммунных заболеваниях

T2-ассоциированные заболевания представляют собой гетерогенную группу иммунопатологий, объединённых общим механизмом — T2-воспалением. Ключевые цитокины этого пути, ИЛ-4 и ИЛ-13, запускают каскад патологических процессов: дифференцировку T-лимфоцитов, переключение синтеза иммуноглобулинов B-клетками на IgE, миграцию эозинофилов в ткани и ремоделирование дыхательных путей. К клиническим проявлениям Th2-ответа относятся анафилактические реакции, бронхиальная астма (БА), аллергический ринит, поллинозы, атопическая экзема, хроническая обструктивная болезнь легких с T2-воспалением (ХОБЛ), хронический риносинусит с назальными полипами, эозинофильный эзофагит, крапивница, к характерным признакам которых относятся эозинофилия и повышенный синтез IgE [16].

Цитокинами, играющими ведущую роль в развитии данных заболеваний, являются ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13, они же стали в настоящее время потенциальными терапевтическими мишенями. Из-за их повреждающего воздействия при хроническом воспалении в бронхах и легких возникает повреждение эпителия, появляются хронические раны, затем возникает фиброз тканей и ремодуляция

бронхов, на уровне мелких бронхов она считается необратимым механизмом, где происходит сужение воздухоносных просветов в бронхах [149].

Препаратами первой линии для терапии IgE-опосредованных аллергических заболеваний служат антигистаминные средства (блокаторы H1-рецепторов) и стабилизаторы мембран тучных клеток, глюкокортикостероиды. Необходимость в лекарственных средствах, подавляющих избыточную активность T2-иммунного ответа для использования в терапии IgE-зависимых патологий достаточно очевидна, поэтому актуален поиск соединений, направленных на коррекцию баланса Th1/Th2 хелперных лимфоцитов и цитокинов.

Аллергия и аутоиммунные заболевания связаны с патологически избыточным Th2 и Th17 иммунным ответом, хронические инфекции и онкологические заболевания сопровождаются недостаточным Th1-типом иммунного ответа, который необходим для повышенной секреции интерферона- γ (ИФН- γ), обладающего противовирусным и противоопухолевым действием [47, 116, 162].

Основная функция клеток Th17 заключается в содействии иммунному ответу против внеклеточных патогенов во время инфекционных процессов, но также они играют важную роль в патогенезе аутоиммунных и воспалительных заболеваний, а также при острой реакции «трансплантат против хозяина» [30, 110]. Функция Th17 может меняться, в зависимости от условий среды, в которой они находятся. Th17 приобретают фенотип, подобный клеткам Th1, в воспалительных средах с заметной продукцией ИФН- γ , что способствует иммунному ответу против грибковых и внеклеточных бактериальных инфекций, а также при аутоиммунном колите, когда активность этих клеток не контролируется должным образом [29]. Th17 могут принимать фенотип Th2 в периферической крови пациентов с астмой, чьи клетки Th17/Th2 секретировали цитокины из обеих профилей (ИЛ-17, ИЛ-22, ИЛ-4 и ИЛ-5), что говорит о способности этих клеток индуцировать воспалительные реакции [59].

1.4 T2-воспаление при онкологических заболеваниях

В иммуноонкологии существует представление, что смещение баланса Th1/Th2 иммунных реакций в сторону Th2 в опухолевом микроокружении

приводит к прогрессированию опухоли, её метастазированию и способствует уходу от иммунного надзора [83, 85, 86].

Опухолевое микроокружение – это среда, состоящая из опухолевых клеток, межклеточного матрикса, сигнальных молекул, нормальных и измененных клеток, в которой растет и развивается опухоль. Клетки опухоли, а также неопухолевое клеточное окружение активно взаимодействуют друг с другом, и эти взаимодействия оказывают влияние на все аспекты канцерогенеза: прогрессию, метастазирование, устойчивость опухоли к терапии, питание опухоли, иммунный надзор. Опухолевые клетки создают вокруг себя благоприятную для роста и развития среду [134]. Одним из главных компонентов опухолевого микроокружения является иммунное опухолевое микроокружение. Иммунная система человека отвечает в том числе и за поддержание тканевого гомеостаза. На начальных этапах развития опухоли компоненты иммунного микроокружения осуществляют иммунный надзор над опухолью. В окружении опухоли развивается воспалительный ответ, направленный на уничтожение опухолевых клеток. В процессе своего развития опухоль вырабатывает механизмы ухода из-под иммунного надзора и устанавливается равновесие между опухолью и иммунным микроокружением. Основную противоопухолевую функцию выполняют клетки, ответственные за Th1-иммунный ответ, такие как: CD8⁺ Т-лимфоциты, Т-хелперы первого типа, Т-регуляторные клетки (Treg), В-клетки, а также клетки врожденного иммунитета: макрофаги, натуральные киллеры, нейтрофилы, моноциты, которые способны к неспецифическому лизису опухолевых клеток. Процесс иммунного ответа на опухоль разделяют на три фазы: элиминацию, равновесие и ускользание [164]. В первой фазе иммунокомпетентные клетки успешно справляются с обнаружением и лизисом опухолевых клеток. Во второй фазе наступает равновесие между элиминацией опухолевых клеток, их прогрессией и размножением. В третьей фазе опухолевые клетки активно используют механизмы ухода от опухолевого надзора, а иммунная система перестает сдерживать рост и распространение опухоли. Активную роль в процессе перехода из фазы равновесия в фазу ускользания может играть T2-воспаление. Накопилось достаточно данных о патогенетической роли Th2 цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13) при различных аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваниях, и если при

аллергии понятен примерно одинаковый механизм патогенеза, то при онкологических и аутоиммунных болезнях механизм не всегда до конца исследован. Установлено, что 20-25% всех онкологических заболеваний возникает в связи с хроническими инфекциями и хроническим воспалением, что характеризуется высокой концентрацией проонкогенных цитокинов в микроокружении опухоли. Хроническое воспаление создает условия для развития опухолей. Длительно текущее воспаление, опосредованное различными клетками и молекулами, такими как лимфоциты, макрофаги и провоспалительными цитокинами (фактор некроза опухоли α (ФНО- α), ИЛ-6), не только способствует опухолевой прогрессии, но и изменяет микроокружение опухоли. Сигнальный путь ИЛ-6/JAK2/STAT3 связан с раком печени, раком молочной железы, колоректальным раком, раком желудка, раком лёгких, раком поджелудочной железы и раком яичников [97]. Путь ИЛ-6/JAK/STAT3 аномально гиперактивирован при многих типах опухолей, и такая гиперактивация обычно связана с плохим клиническим прогнозом. В микроокружении опухоли сигнальный путь ИЛ-6/JAK/STAT3 управляет пролиферацией, выживанием, и метастазированием опухолевых клеток, при этом угнетая противоопухолевый иммунный ответ. Таким образом, лекарственные средства, мишенью которых является путь ИЛ-6/JAK/STAT3, могут оказывать терапевтический эффект путем прямого ингибирования роста опухолевых клеток и стимуляции противоопухолевого иммунитета. Лекарственные средства, влияющие на ИЛ-6, рецептор ИЛ-6 или янус-киназы (JAK), получили одобрение Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) для лечения воспалительных заболеваний и миелопролиферативных новообразований, а также для коррекции некоторых побочных эффектов терапии Т-клетками с химерными антигенными рецепторами и проходят дальнейшую оценку у пациентов с гемопоэтическими злокачественными новообразованиями и солидными опухолями [106].

Активация сигнального пути JAK/STAT3 под действием провоспалительного цитокина ИЛ-6 идентифицирована как ключевой механизм, стимулирующий пролиферацию и метастатическое распространение клеток широкого спектра злокачественных опухолей, согласно данным экспериментальных и клинических исследований [181]. Сигнальный каскад рецепторов ИЛ-6 и ИЛ-11 начинается с

образования лиганд-альфа-субъединичного комплекса, который вызывает гомодимеризацию gp130. Это приводит к рекрутингу и перекрестной активации JAK-киназ (JAK1, JAK2, TYK2). Активированные JAK фосфорилируют фактор STAT3, который, в виде димера, перемещается в ядро для индукции генов опухолевой трансформации. Одновременно фосфорилирование тирозиновых остатков на gp130 создает сайты для связывания регуляторных белков SOCS3 (ингибитор) и SHP2, последний из которых запускает путь RAS/ERK. [106]. Хроническое воспаление способствует онкогенезу не только путем активации молекулярных путей NF-κB and MAPK, но и путем накопления генетических мутаций и отбора более агрессивных клеточных клонов.

Как только опухоль развилась, она может поддерживать воспаление с помощью секреции провоспалительных цитокинов и привлечения в опухолевое микроокружение супрессивных иммунных клеток, изменяя клеточный иммунный состав микроокружения. Данные клетки подавляют противоопухолевый иммунный ответ в микроокружении путем нарушения презентации антигенов и активации цитотоксических Т-лимфоцитов. Таким образом, взаимодействие между процессом хронического воспаления и опухолью является двунаправленным и играет фундаментальную роль в канцерогенезе и опухолевой прогрессии [81]. Очаг хронического воспаления также служит источником аларминов, которые приводят к постоянной индукции T2 иммунного ответа. В иммунном опухолевом микроокружении в большом количестве встречаются клетки, активно участвующие в T2-воспалении: Th2, ILC-2, опухоль-ассоциированные макрофаги (TAM) M2-типа (M2) [168]. Th2-клетки и ILC-2 клетки секретируют ИЛ4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13 в опухолевом микроокружении, тем самым с помощью разных механизмов создавая благоприятную среду для прогрессии и метастазирования опухоли.

В первичной опухоли M2 – макрофаги возникают под действием колониестимулирующего фактора-1 (CSF-1) и ИЛ-4, продуцируемого Th2-клеткам. M2 секретируют васкулярный эндотелиальный фактор роста А (VEGFA), который приводит к миграции опухолевых клеток к макрофагам вдоль коллагеновых волокон, которые действуют как пути к кровеносным сосудам. Опухолевые клетки скапливаются в сосудах, где макрофаги способствуют их интравасации в кровеносные или лимфатические сосуды через структуру, названную опухолевым

микроокружением метастаз [191]. Также VEGFA вызывает неоангиогенез в опухоли, который способствует её питанию и метастазированию. М2-макрофаги способствуют эпителиально-мезенхимальному переходу опухолевых клеток, что является важнейшим условием для их метастазирования. Приобретая мезенхимальный фенотип, опухолевые клетки становятся более подвижными и устойчивыми к внешним воздействиям, лучше переносят движение в потоке крови.

ИЛ-4 оказывает преимущественно проопухолевую роль. В экспериментальной модели рака на мышах, связанного с колитом, генетический дефицит ИЛ-4 (таким образом, удаляя эндогенные сигналы ИЛ-4) снижал опухолевую нагрузку [152]. ИЛ-4 может способствовать онкогенезу посредством нескольких предполагаемых механизмов, в том числе посредством индукции клеток Th2, которые продуцируют другие проопухолевые цитокины, такие как ИЛ-13 [107]. ИЛ-4 вызывает поляризацию макрофагов в фенотип М2, с хорошо документированными проопухолевыми функциями в микроокружении опухоли [135, 141]. Опухолевые клетки экспрессируют повышенные уровни рецептора к ИЛ-4, а сигнализация ИЛ-4 снижает апоптоз раковых клеток посредством повышения регуляции антиапоптотических генов, а также напрямую стимулирует пролиферацию опухолевых клеток через STAT6 [118, 142]. Вместе с ИЛ-13 ИЛ-4 может способствовать ингибированию противоопухолевого иммунитета супрессорными клетками миелоидного происхождения (MDSC), как было показано в исследовании, в котором оказалось, что подавление CD8+ Т-клеток, опосредованное MDSC, критически зависит от сигнальных путей ИЛ-4 и ИЛ-13 [107, 135, 141, 176]. В модели спорадического колоректального рака (КРР) генетический дефицит ИЛ-13 значительно снижал опухолевую нагрузку, а адоптивный перенос ILC-2 с ИЛ-13 по сравнению с ILC-2 без ИЛ-13 привел к усилению активации MDSC и подавлению противоопухолевых ИФН- γ + CD8+ Т-клеток и Th1-клеток [107]. Важно отметить, что при культивировании MDSC с ILC-2, нейтрализация ИЛ-4 и ИЛ-13, секретлируемых ILC-2, перепрограммировала MDSC в противоопухолевый фенотип, характеризующийся усиленной активацией CD8+ Т-клеток и экспрессией ИФН- γ + и гранзима. Аналогично в исследовании рака мочевого пузыря обнаружение ИЛ-13 в образцах мочи пациентов коррелировало с повышенной распространенностью ILC-2 и MDSC и сниженным

количеством Т-клеток [56]. ИЛ-13 может напрямую способствовать пролиферации раковых клеток и метастазированию через альтернативный рецептор ИЛ-13R α 2, например, при раке поджелудочной железы [174]. Экспрессия рецептора к ИЛ-13 увеличивается при широком спектре солидных опухолей включая колоректальный рак, глиобластому, рак молочной железы и рак поджелудочной железы, и связана с плохим прогнозом [111].

ИЛ-10 – повышенный уровень ИЛ-10 оказывает опухолестимулирующее действие, стимулируя рост и пролиферацию опухолевых клеток посредством активации STAT3, ингибируя апоптоз и позволяя уходить от иммунного надзора путем ингибирования функции ДК, снижения экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса I на поверхности опухолевых клеток, привлечения Treg, подавление цитотоксической активности НК-клеток и нарушение активации Th1 CD4⁺ и цитотоксических CD8⁺ Т-клеток [52, 53, 72, 92, 161]. Повышенная экспрессия ИЛ-10 в первичных опухолевых клетках и ТАМ, была предложена в качестве маркера прогрессирования рака и развития метастазов [61, 101, 193]. Уровень циркулирующего ИЛ-10 повышен в сыворотке крови пациентов с разными видами опухолей, что часто сопровождается повышением других воспалительных маркеров и коррелирует с плохим прогнозом [109, 115, 198].

ИЛ-5 участвует в иммунных реакциях 2-го типа в основном через эозинофилы, которые являются одними из основных эффекторных клеток, путем поддержки их размножения, дифференцировки, рекрутинга и активации. [180, 201]. ИЛ-5 обладает проопухолевыми свойствами: одно из исследований показало, что активированные ИЛ-5 эозинофилы повышают регуляцию гликолиза, что приводит к истощению глюкозы в микроокружении опухоли. Это приводит к усилению метастазирования опухолей в легкие из-за нарушения эффекторной функции НК-клеток, которая критически зависит от глюкозы [169]. В другом исследовании обнаружено, что ИЛ-5 и эозинофилы способствуют метастазированию в легкие клетками колоректального рака (КРР) МС38, посредством привлечения Tregs в ответ на секрецию эозинофилами хемокина CCL22 [201]. В этой модели нейтрализация ИЛ-5 антителами снижала метастазирование, в то время как адаптивный перенос эозинофилов усиливал распространение опухоли.

Прогностические исследования на людях показали, что эозинофилы связаны с плохой выживаемостью у пациентов с лимфомой Ходжкина, лейкемией и раком шейки матки [184].

В клинических исследованиях было установлено, что соотношение Th1/Th2 клеток может служить прогностическим маркером при некоторых типах рака молочной железы [197]. Соотношение Th1/Th2 цитокинов было уменьшено у большинства больных раком легкого, рака мочевого пузыря, и при других онкологических заболеваниях. Поэтому актуален поиск препаратов, нормализующих баланс Th1/Th2 цитокинов [55]. При этом все вышеперечисленные клетки и цитокины могут и усиливать противоопухолевый иммунный ответ. Вероятно, направленность T2-воспаления определяется сложными взаимоотношениями между всеми компонентами иммунного микроокружения и особенностями самой опухоли [42, 108, 172].

Таким образом, показана связь между хроническим воспалением, T2-иммунным ответом и онкологическими заболеваниями. Несмотря на то, что постоянно появляются новые данные, усложняющие картину взаимоотношений иммунного опухолевого микроокружения и опухоли, применение лекарственных средств, направленных на вышеперечисленные патофизиологические механизмы, считается перспективным направлением развития иммуноонкологии.

1.5 Меланома

Меланома – агрессивная злокачественная опухоль, развивающаяся из меланоцитов. Меланома находится на 12 месте по распространенности среди всех опухолей, при этом она является причиной 80% смертей от злокачественных новообразований кожи [144]. Высокая смертность от меланомы объясняется её способностью адаптироваться к терапии и агрессивным метастазированием.

Встречаются несколько форм меланомы: поверхностно-распространяющаяся, узловая, злокачественная лентиго-меланома, акральная меланома. Наиболее распространенной является поверхностно-распространяющаяся форма.

Основными причинами развития меланомы являются: воздействие ультрафиолета на кожу, появление или рост диспластических пигментных невусов,

механическое травмирование невусов, наследственные факторы в виде рожденной склонности к образованию невусов или наличие меланомы в прошлом у одного из родственников. Воздействие ультрафиолетового излучения приводит к образованию циклобутановых димеров и пиримидин-пиримидиновых фотопродуктов в ДНК, что в свою очередь приводит к замене цитозинового основания на тиминовое в процессе репарации, репликации ДНК и появлению мутаций [167].

В основе онкогенеза меланомы лежат мутации генов, затрагивающих два основных сигнальных пути в меланоцитах (PI3)/АКТ и RAS/RAF/MEK/ERK.

Изменения в сигнальном пути RAS/RAF/MEK/ERK встречаются в 90% случаев. Включение данного сигнального пути приводит к активации транскрипционных факторов, что вызывает рост клеток, их пролиферацию, миграцию, нарушение апоптоза и клеточного цикла [31]. В 60% мутация приходится на серин/треонинкиназу BRAF. Встречаются несколько вариантов таких мутаций: замена валина на глутаминовую кислоту (V600E), замена валина на лизин или замена на аргинин). Мутировавшая киназа BRAF активирует ERK-киназу, активируемую внеклеточными сигналами, которая является конечным эффектором сигнального пути MAPK.

В 25% случаев мутация приходится на NRAS гтф-азу, которая участвует в работе обоих сигнальных путей [71]. Активация PI3K/АКТ приводит к активации комплекса mTog, ответственного за регуляцию производства необходимых метаболитов и энергии для роста и размножения клеток. Для воздействия на данные мишени активно применяются таргетные препараты, такие как BRAF-ингибиторы, MEK-ингибиторы и ингибиторы пути PI3K-АКТ-mTOR. В новых исследованиях показано, что своеобразие иммунологического ландшафта меланомы зависит в том числе и от типа приобретенной мутации. Например, показано, что V600K мутации в BRAF лучше отвечают на лечение ингибиторами PD-1 [159].

Меланома относится к иммунологически «горячим» опухолям. Вследствие высокой мутационной нагрузки, клетки меланомы активно экспрессируют опухоль-ассоциированные неоантигены, которые могут стать целью для иммунокомпетентных клеток [186]. Именно поэтому меланома хорошо отвечает на

иммунотерапию, такую как использование ИКТ anti-PD1 (пембролизумаб) и anti-CTLA4 (ипилимумаб), которые напрямую влияют на функцию лимфоцитов. Несмотря на высокую мутационную нагрузку, иммунная система не в состоянии держать под контролем рост и развитие меланомы, хотя известны случаи спонтанной регрессии опухоли [43]. Это объясняется высокой гетерогенностью популяции иммунных клеток, инфильтрирующих данную конкретную опухоль и их взаимодействиями. Сильная инфильтрация меланомы лимфоцитами рассматривается как хороший прогностический маркер, но не всегда гарантирует позитивный клинический исход. Основной компонентой иммунологического микроокружения меланомы являются CD8+/CD4+ Т-лимфоциты. Цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты рассматриваются как один из лучших индикаторов выживаемости при меланоме, особенно субпопуляции, несущие на себе CD69 – маркер активации [103].

На данный момент исследования по иммунному микроокружению меланомы сконцентрированы в основном вокруг Т1-воспалительного ответа и связаны с активным применением ИКТ. В то время как исследования по Т2-иммунному ответу в микроокружении меланомы практически не встречаются, тем не менее в мировой литературе можно обнаружить данные о влиянии клеток и цитокинов, ассоциированных с Т2-воспалением, на иммунные процессы в микроокружении меланомы. Известно, что в микроокружении меланомы можно обнаружить клетки Th2, Treg, MDSC, макрофаги фенотипа M2 [35]. Все вышеперечисленные клетки активно играют роль в иммуносупрессии и формирование проопухолевого микроокружения. Особый интерес представляют Т-хелперы первого и второго типа, которые во многом регулируют состояние иммунного ответа в микроокружении опухоли. Известно, что Th2 клетки, обнаруженные в крови пациентов с колоректальным раком и меланомой, секретируют большое количество иммуносупрессивного ИЛ-10 и ИЛ-4, который подавляет активность Th1-клеток [84]. По данным исследований, опухоль-инфильтрирующие CD4+ лимфоциты (Т-хелперы) путем не прямой презентации антигенов могут индуцировать активность иммуносупрессивных Treg при меланоме как у человека, так и в экспериментах на животных [131, 151]. Количество миелоидных супрессорных клеток было повышено в крови у пациентов с меланомой, которые не отвечали на

терапию ИКТ, по сравнению с пациентами, получившим положительный ответ на терапию [158]. ИЛ-4 индуцированная 1 аминоксидаза, которая отвечает за метаболизм индолов и обладает иммунорегуляторной функцией, способна снижать эффективность терапии ИКТ, что показано на животных моделях, за счет нарушения инфильтрации меланомы клетками CD8+ [94]. Показано, что у пациентов с метастатической меланомой в плазме крови повышены концентрации T2-интерлейкинов, таких как ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ИЛ-13 по сравнению с пациентами, у которых опухоль была удалена хирургическим путем [145].

Несмотря на ограниченное количество исследований и их контекст, в основном связанный с иммунотерапией ИКТ, можно сделать вывод, что T2-воспалительный ответ также влияет и на микроокружение меланомы, вызывая иммуносупрессию и препятствуя эффективному применению ИКТ.

1.6 Рак молочной железы

Рак молочной железы (РМЖ) – это злокачественная опухоль, развивающаяся из эпителия молочной железы [1].

РМЖ наиболее распространенное злокачественное новообразование, диагностируемое у женщин. В 2022 году было зарегистрировано более 2 миллионов случаев рака молочной железы, также он находится на 4 месте в рейтинге смертности от всех случаев онкологических заболеваний [178].

К основным факторам риска развития рака молочной железы относятся пол, возраст, гормональный статус, репродуктивные и генетические факторы.

Различают несколько клинических форм РМЖ: узловую, диффузную (отечно-инфильтративную, рожистоподобную, маститоподобную и панцирную), а также рак Педжета (соска).

В терапии рака молочной железы активно применяются такие методы как хирургическое лечение, лучевая терапия, химиотерапия и таргетная, гормональная терапия.

Выбор препаратов для химиотерапии РМЖ основывается на экспрессии рецептора к эстрогену (ER), рецептора к прогестерону (PR), рецептора к человеческому эпидермальному фактору роста 2 (HER2) и маркера пролиферативной активности опухолевой клетки Ki-67. На основе данных об

экспрессии данных маркеров РМЖ разделяют на 5 подтипов: люминальный А, люминальный В (HER2-отрицательный), люминальный В (HER2-положительный), HER2-положительный (не люминальный) и базальноподобный (тройной негативный протоковый РМЖ). Тройной негативный РМЖ (TNBC) представляет собой наиболее неблагоприятную по прогнозу форму РМЖ.

По сравнению с подтипом HR+, который характеризуется низкой инфильтрацией опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), подтипы TNBC и HER2+ связаны с высокой инфильтрацией TIL [40, 124]. Примечательно, что более высокие уровни TIL связаны с улучшенным прогнозом и сниженным риском рецидива и смерти [126, 143]. Терапия ИКТ, нацеленная на рецептор PD-1, PD-L1 и CTLA-4, показала высокую клиническую эффективность у пациентов с разными опухолями [196]. Все больше исследований показывают, что ИКТ имеет клинический ответ против распространенного РМЖ. К сожалению, только небольшая часть пациентов (менее 20%) с РМЖ может получить значимый клинический ответ при терапии ИКТ [28, 99, 157].

Согласно данным литературы, инфильтрация и активация Т-клеток в иммунном микроокружении опухоли важны для противоопухолевого эффекта при терапии РМЖ [79]. В исследовании Ruffel et al. показано, что опухолевая ткань РМЖ выражено инфильтрирована CD3+-лимфоцитами, а также отмечено, что по сравнению с нормальной тканью молочной железы в опухолевой преобладают клетки Т2-иммунного ответа, такие как В-лимфоциты и CD4+-хелперы [166]. Иммунная реакция вызванная Th2 и Th17-хелперами, приводит к усилению роста и диссеминации опухолевых клеток рака молочной железы [65, 70]. Показано, что секреция Th2-клетками в микроокружении РМЖ ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-13 способствует активации и поляризации M2-макрофагов, обладающих проопухолевыми свойствами [66]. Более того, иммунные ответы типа Th2 обычно сопровождаются увеличением инфильтрации MDSCs и Tregs, что способствует проопухолевому иммунитету [204]. В одном исследовании обнаружена отрицательная корреляция между инфильтрацией Th2-клетками и инфильтрацией, и функцией CD8+ клеток при РМЖ [55]. В этом же исследовании показано, что нацеливание на опосредованный Th2 иммунитет с помощью IPD (иммунотропное соединение) может поляризовать TAMs в сторону противоопухолевого фенотипа

M1, что предполагает, что блокирование опосредованного Th2 иммунитета и может снизить опосредованную TAMs иммуносупрессию. IPD ингибирует секрецию ИЛ-4 и ИЛ-5, полученных из Th2-клеток, и, таким образом, определяется как ингибитор цитокинов Th2 [138, 148]. IPD увеличило соотношение клеток Th1/Th2 при РМЖ и снизило концентрацию ИЛ-4 как в периферической крови, так и в опухоли. IPD активировало противоопухолевый иммунный ответ и ингибировало рост РМЖ путем усиления инфильтрации и пролиферации цитотоксических CD8⁺ Т-клеток, а также стимуляции секреции цитокинов CD8⁺ Т-клетками, что указывает на то, что противоопухолевый иммунитет Т-клеток активируется при ингибировании цитокинов Th2. Таким образом, фармакологическая модификация Th2-опосредованного иммунитета, может усилить ответ при терапии ИКТ посредством стимулирования противоопухолевой активности цитотоксических CD8⁺ Т-клеток при РМЖ [55].

Вышеперечисленные данные позволяют установить тесную связь между T2-воспалением и течением РМЖ: T2-воспаление приводит к формированию проопухолевого иммунного микроокружения.

Циклооксигеназы – это ферменты, метаболизирующие арахидоновую кислоту до медиаторов воспаления, таких как простагландины (ПГ), лейкотриены и тромбоксаны. ПГ быстро накапливаются в очаге повреждения и вызывают сосудистую реакцию, которая отвечает за инициацию и поддержание воспаления. ПГ также участвуют в хроническом воспалении, которое, связано с развитием более 15% всех опухолей [189].

Многочисленные эксперименты *in vivo* с участием различных моделей рака молочной железы у мышей ясно показывают, что ингибирование ЦОГ-2 сдерживает развитие опухолей молочной железы. Например, было обнаружено, что неселективные ингибиторы, такие как индометацин, флурбипрофен и аспирин, снижают частоту опухолей, вызванных канцерогенами [136, 146]. Селективные ингибиторы ЦОГ-2, такие как целекоксиб и нимесулид, задерживали начало развития и снижали частоту развития опухолей. При этом целекоксиб был более эффективен, чем неселективный ибупрофен [88, 140]. Повышенная экспрессия ЦОГ-2 оказалась достаточным условием для инициации канцерогенеза у мышей HER2/neu после множественных беременностей [121].

Выявлено несколько механизмов инициации и прогрессирования опухолей, зависящих от ЦОГ-2 при РМЖ. К ним относятся антиапоптотическая и проангиогенная активность, иммуносупрессия, нарушения клеточного цикла. Исследования на животных моделях показали, что ЦОГ-2 влияет как на развитие рака, так и на его рост и васкуляризацию. У животных с ингибированием активности ЦОГ-2 наблюдалась сниженная плотность микрососудов, что также коррелировало с пониженной экспрессией генов, ответственных за ангиогенез, например, VEGF. Повышенная экспрессия ЦОГ-2 при РМЖ сопровождается повышенным биосинтезом простагландина E2 (PGE2). PGE2 влияет на образование метастазов в костях путем индукции ИЛ-8, ИЛ-11 и остеокластов [175, 200].

Нарушение нормального клеточного цикла при РМЖ обусловлено ЦОГ-2-зависимой повышенной экспрессией антиапоптотического BCL-2, а также нарушением регуляции проапоптотических BAX и BCL-xL. Клетки РМЖ становятся устойчивыми к апоптозу из-за активации серин-треониновой киназы Akt, связанной с ЦОГ-2, которая является важным компонентом сигнального пути Akt/PI3/mTOR, который способствует выживанию клеток. Этот эффект был подтвержден в исследовании *in vitro* с использованием линий клеток ER-HER2+ [78].

В других исследованиях показано, что селективный ингибитор ЦОГ-2 целекоксиб активирует внутренний путь апоптоза путем стимуляции каспазы 3 и каспазы 9 [200]. Повышенная активность ЦОГ-2 при РМЖ приводит к дефициту арахидоновой кислоты, которая является стимулятором апоптоза [96].

Повышение уровня ЦОГ-2 способствует повышению внутриклеточной концентрации циклина D1, который регулирует переход от фазы G1 к фазе S [120]. Таким образом, ингибирование ЦОГ-2 целекоксибом в клетках РМЖ приводит к остановке клеточного цикла в G1 фазе, что снижает количество клеток в фазах S и G2/M, тем самым подавляя деление клеток [98, 200].

ЦОГ-2 играет важную роль в уходе от иммунного надзора. ПГ отрицательно влияют на активность Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров (НК) и ДК. Они также снижают синтез ФНО α и усиливают активность иммуносупрессивного ИЛ-10 [96].

Согласно опубликованным исследованиям, снижение экспрессии ЦОГ-2 в клетках РМЖ привело к усилению инфильтрации тканей цитотоксическими Т-лимфоцитами. Применение селективных ингибиторов ЦОГ-2 при РМЖ вызвало усиленное привлечение иммунокомпетентных клеток в микроокружение опухоли [98, 133].

Таким образом, разработка способов воздействия на иммунный компонент РМЖ являются перспективными направлениями исследований преодоления резистентности к иммунотерапии и улучшения клинической эффективности терапии.

1.7 Колоректальный рак

Колоректальный рак – третий по распространенности в мире среди онкологических заболеваний. К факторам риска развития КРР относят гиподинамию, курение, неправильную диету, но наиболее высокий риск встречается у пациентов с генетической предрасположенностью (семейный аденоматозный полипоз, КРР у родственников) и воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), такими как болезнь Крона (БК) и неспецифический язвенный колит (НЯК).

КРР, ассоциированный с колитом, составляет около 5% всех случаев колоректального рака [205]. Опухоли развиваются из-за хронического воспаления при том или ином типе ВЗК, число которых неуклонно растет [128].

ВЗК увеличивает риск развития рака, создавая благоприятную среду для злокачественной трансформации клеток. Цитокины, факторы роста и хемокины поддерживают высокую скорость пролиферации, являясь сигналами выживания клеток, а также способствуют неоангиогенезу. В конечном итоге эти молекулы нарушают метаболические пути, усиливают воспаление и вызывают мутации в генах, связанных с раком. Все это приводит к развитию дисплазии в эпителиальных клетках кишечника, стимулируя рост клеток и индуцируя различные формы гибели клеток, тем самым ухудшая течение заболевания. После того, как иммуносупрессивное опухолевое микроокружение сформируется, опухолевые клетки уходят от обнаружения иммунной системой и адаптируют свой энергетический метаболизм, чтобы справляться с низким уровнем глюкозы и

накоплением продуктов метаболизма. Кроме того, ферменты, которые модифицируют внеклеточный матрикс, такие как металлопротеиназы, облегчают такие процессы, как эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и другие механизмы канцерогенеза, включая нестабильность генома, изменение энергетического метаболизма и уклонение от надзора иммунной системы [51, 87].

В микроокружении рака толстой кишки клетки Th1, Th2 и Th17 выполняют сложные и взаимозависимые функции, которые влияют на развитие и прогрессирование опухоли. В то время как клетки Th1 и Th17 участвуют в воспалении, связанном с ВЗК, с секрецией цитокинов, таких как ФНО- α , ИФН- γ и ИЛ-6, ИЛ-17, ИЛ-22 и ИЛ-21 Th17, клетки Th2 способствуют воспалению слизистой оболочки кишечника при НЯК, секретируя ИЛ-4 [174]. В контексте КРР было отмечено, что клетки Th1 оказывают защитное действие, в то время как клетки Th2 и Th17 связаны с развитием опухоли и ангиогенезом. Кроме того, повышенный уровень ФНО- α и ИФН- γ в воспаленной толстой кишке способствует прогрессированию колит-ассоциированного рака [74]. Активация STAT3 большинством сигнальных молекул в первую очередь трансдуцируется через активацию STAT3 ИЛ-6. Путь Notch действует как эффектор сигнального пути ИЛ-6/STAT3, регулируя деление клеток, дифференцировку и канцерогенез [117].

То, что T2-воспаление связано с развитием КРР, показано на примере исследования, в котором продемонстрирована связь между полиморфизмами в генах рецепторов ИЛ-4, ИЛ-4а и ИЛ-13, и развитием злокачественных заболеваний кишечника [171]. На примере ряда исследований было показано, что ИЛ-4 и ИЛ-13 через сигнальные пути со STAT6 связаны с опухолевой прогрессией [64, 155, 205].

Генетическая делеция STAT6 (передатчика сигнала для ИЛ-4) угнетала пролиферацию опухолевых клеток в модели аденоматозного полипоза толстой кишки [105].

ИЛ-4 вызывает поляризацию макрофагов к фенотипу M2 (TAM), с хорошо документированными проопухолевыми функциями в микроокружении опухоли [135, 141].

На ранних стадиях колит-ассоциированного рака длительная активация макрофагов M1 и провоспалительные реакции увеличивают риск канцерогенеза. Макрофаги M1 могут подавлять M2 посредством механизмов окислительного

стресса и конкуренции за цитокины и хемокины. Однако на более поздних стадиях M2 ингибирует функцию M1, влияя на пути STAT3 и PI3K/AKT, способствуя ангиогенезу, ремоделированию тканей и подавлению противоопухолевого ответа, способствуя формированию иммуносупрессивного опухолевого микроокружения. [38, 130]. Во время прогрессирования КРР существует динамический баланс между макрофагами M1 и M2.

В кишечнике ИЛ-25 экспрессируется пучковыми клетками и является ключевым фактором активации ILC2 в защитных иммунных реакциях на паразитарные гельминтные инфекции, облегчая взаимодействие между врожденным и адаптивным иммунитетом и способствуя восстановлению тканей после повреждения [150, 188].

По данным литературы известно, что ILC2-клетки обнаруживаются в больших количествах в биоптатах человеческого КРР. Эти исследования демонстрируют, что повышенный уровень ILC2 может быть связан с нарушением противоопухолевого иммунитета Т-клеток [50, 163, 194]. Также обнаружено, что при КРР обнаруживается большое количество IL-25R+ ILC2 клеток, которые положительно коррелируют с M-MDSC, в то время как отрицательно коррелируют с противоопухолевыми Th1 и CD8+ Т-клетками [107]. Инфильтрация Th1 и CD8+ Т-клетками является одним из самых сильных положительных прогностических факторов для выживания пациентов с КРР на всех стадиях заболевания [77, 153]. Корреляционный анализ показал значительную отрицательную корреляцию между опухолевыми CD8+ Т-клетками и ILC2 в КРР человека, а также между Th1-клетками и ILC2, что позволяет предположить, что КРР с более высокой частотой ILC2 могут иметь нарушения противоопухолевого ответа Т-клеток и худший прогноз [107].

В контексте хронического воспаления кишечника ось IL-23/Th-17 выступает в качестве основного звена в развитии опухоли. Нарушение эпителиального барьера кишечника, характерное для ВЗК, запускает активацию ДК продуктами жизнедеятельности микробиома кишечника. Эти активированные ДК, в свою очередь, секретируют ИЛ-23 – цитокин, который вызывает дифференциацию и активацию клеток Th17. Сигнальный путь IL-6/STAT3 играет фундаментальную роль в этом процессе дифференциации, опосредованном ИЛ-23 [102]. Клетки Th17,

активированные ИЛ-23, высвобождают провоспалительные цитокины, такие как ИЛ-17А и ИЛ-17F, которые посредством активации пути STAT3/NF-κB стимулируют выработку дополнительных провоспалительных цитокинов, включая ИЛ-6 и ФНО-α [54, 192].

Возникновение рака тесно связано с повышенной экспрессией ЦОГ-2, которая была отмечена в большинстве случаев КРР [173]. Роль ЦОГ-2 в канцерогенезе КРР продемонстрирована *in vivo* на мышинной модели, а биологические эффекты усиления активности фермента опосредованы преимущественно через повышенную выработку простагландина PGE2 [195]. PGE2 также может способствовать росту и размножению стволовых клеток КРР через PI3K [189].

ЦОГ-2 играет важную роль в метастазировании колоректального рака. Например, трансактивация EGFR Src может способствовать лекарственной устойчивости КРР [165]. Кроме того, повышенная экспрессия ЦОГ-2 может влиять на адгезионные свойства клеток кишечника и способствовать активности матриксной металлопротеиназы и, таким образом, инвазии рака [137]. В исследованиях на животных показано, что ингибирование ЦОГ-2 может противодействовать метастазам колоректального рака [93].

Таким образом было показано, что Т2-воспаление и хроническое воспаление являются важными патофизиологическими механизмами развития КРР. Применение противовоспалительных средств уже активно рассматривается как одна из терапевтических стратегий не только предотвращения развития КРР, но и его прогрессирования и метастазирования.

1.8 Анемия при онкологических заболеваниях

Анемия – это состояние, которое характеризуется пониженным числом эритроцитов или уровнем концентрации гемоглобина в них

Критерии анемии по ВОЗ:

У женщин концентрация гемоглобина менее 120 г/л, число эритроцитов менее 3,8 млн/мкл, гематокрит менее 36%.

У мужчин концентрация гемоглобина <130 г/л, число эритроцитов <4,0 млн/мкл, гематокрит <39%.

Анемия часто встречается как сопутствующее заболевание у онкологических больных. Основной причиной развития анемии у данной когорты пациентов является применение химиотерапевтических препаратов, обладающих способностью угнетать кроветворение из-за токсического действия на клетки костного мозга. После начала курса химиотерапии примерно у 70% пациентов выявляется анемия. Тем не менее примерно у 30% пациентов с опухолями анемия выявляется до начала химиотерапии [125]. Основные причины развития анемии у онкобольных: уменьшение длительности жизни эритроцитов вкупе с увеличением их разрушения, угнетение эритропоэза в костном мозге, влияние воспаления на синтез эритропоэтина, снижение доступности железа из-за стимуляции секреции гепцидина. Состояние хронического воспаления, возникающее на фоне взаимодействия иммунной системы и опухоли, является причиной запуска вышеперечисленных патофизиологических механизмов анемии у онкобольных. Активно в этом процессе принимают участие ряд цитокинов, таких как ИЛ-1, ФНО- α и ИЛ-6, ИФН- γ .

ИЛ-1 угнетает развитие предшественников эритроцитов, снижает экспрессию эритропоэтина и рецепторов к эритропоэтину. Также ИЛ-1 стимулирует поглощение эритроцитов макрофагами, что приводит к их преждевременной деградации, а также к уменьшению длительности их жизненного цикла [39].

ФНО- α усиливает апоптоз незрелых эритроцитов и снижает восприимчивость предшественников эритроцитов к эритропоэтину. Большое влияние оказывает ФНО- α на метаболизм липидов у пациентов на поздних стадиях онкологических заболеваний, что приводит к липоатрофии и угнетению кроветворения [182].

ИЛ-6, активно секретирующийся иммунокомпетентными клетками, влияет на эритропоэз через различные механизмы. Одним из них является повышение синтеза и секреции гепцидина клетками печени, что приводит к функциональному дефициту железа. Гепцидин – это гормон, связывающийся с ферропонином, вызывающий его интернализацию и последующую деградацию в энтероцитах и макрофагах, тем самым он препятствует транспорту железа в сыворотку крови. ИЛ-6 через сигнальный путь JAK-STAT3 регулирует работу сигнального пути

PI3K/Akt/mTOR, активация которого совместно с низкой доступностью аминокислот на поздних стадиях онкологических заболеваний приводит к нарушению созревания эритроцитов [33].

ИФН- γ уменьшает количество эритробластов, тем самым снижая уровень эритроферрона, который подавляет активность гепсидина на ранних стадиях гемопоэза [129].

Таким образом, показана взаимосвязь между иммунным статусом онкобольных и формированию у них анемии. Соответственно одним из перспективных подходов к терапии опухоль-ассоциированной анемии, может быть, коррекция иммунологических нарушений.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Экспериментальные животные

Исследования были выполнены на самцах мышей линии BALB/c, самцах и самках мышей линии C57Bl/6 массой 18-20 г, крысах-самцах линии Wistar массой 140-160 г, самцах аутбредных крыс массой 160-180 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Животных содержали в виварии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» при 12-часовом световом режиме на стандартном сбалансированном брикетированном корме со свободным доступом к пище и воде при естественном освещении и температуре воздуха 20-24 °С, 45-56% относительной влажности. Организацию и проведение работ осуществляли в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» и директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, и правилами работы с животными, утвержденными этической комиссией ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий».

Общее количество использованных животных составило: 442 мыши, 130 крыс. Условия содержания животных соответствуют требованиям, указанным в межгосударственном стандарте РФ ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

2.2 Опухолевые клеточные линии

Опухолевые клеточные линии меланомы B16, аденокарциномы молочной железы Ca755 и аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ были получены из лаборатории «Биоресурсная коллекция клеточных линий и первичных опухолей» ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России и поддерживались перевиванием опухолевой культуры на мышях различных линий в соответствии с методическими

рекомендациями. Клеточная линия Jurkat («Т-лимфобластная лейкемия человека») из клеточного банка ФГБНУ «НИИ Общей Патологии и Патофизиологии». Клетки поддерживали культивированием с соблюдением условий стерильности в полной питательной среде RPMI-1640 с глутамином («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят («Биолот», Россия), подвергнутой инаktivации в течение 30 мин при температуре 56 °С, с добавлением гентамицина («ПанЭко», Россия) и аминокислот для среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) в полуоткрытой системе при температуре 37 °С в атмосфере 5%-го CO₂.

2.3 Исследуемые вещества

Соединение СНК-411 (2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин) с выраженными противоопухолевыми и иммуномодулирующими свойствами было синтезировано в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» и запатентовано (патент РФ 2518889 от 10.06.2014) (рисунок 8) [13]. В соответствии с классификацией токсичности веществ К.К. Сидорова (1973 г.), соединение СНК-411 является малотоксичным и относится к 4 классу токсичности, а также к 3 классу опасности для перорального способа введения в соответствии с ГОСТ 12.1.007-16. СНК-411 растворимо в воде при температуре +70 °С. Молекулярная масса СНК-411 равна 180 а.е.м.

Соединение СНК-578 (гидрохлорид 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин), обладающее противоопухолевой и антиметастатической активностью, а также с выраженными противовоспалительными и противоаллергическими свойствами, было синтезировано в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» и запатентовано (патент РФ 2686672 от 30.04.2019) (рисунок 1.9) [14]. Молекулярная масса СНК-578 равна 216 а.е.м. СНК-578 растворимо в воде при комнатной температуре.



Рисунок 8 – Структурные формулы СНК-411 (слева) и СНК-578 (справа)

Согласно классификации токсичности веществ К.К. Сидорова (1973 г.), соединение СНК-578 является малотоксичным и относится к 4 классу токсичности.

Спектры ЯМР ^1H записаны на приборе BRUKER AM-300 с рабочей частотой 300 МГц в DMSO (внутренний стандарт тетраметилсилан). Температуры плавления определяли на приборе OptiMelt MPA100 и не корректировали. Результаты элементных анализов на С, Н и Cl соответствуют вычисленным значениям.

СНК-411 Спектр ЯМР ^1H (DMSO $-d_6$) δ м.д.: 0,84 (д, 6H, J 6,6 (CH₃)₂); 2,10 (м, 1H, J₁=6,99 Hz; J₂=6,62 Hz, CH); 2,31 (с, 6H, (CH₃)₂); 2,53 (д, 2H, J 7,0, CH₂); 8,90 (с, 1H, OH).

СНК-578 Спектр ЯМР ^1H (DMSO $-d_6$) δ м.д.: 0,91 (д, 6H, J=6,7 Hz, (CH₃)₂); 2,18 (м, 1H, J₁=7,2 Hz, J₂=6,7 Hz, CH); 2,57 (с, 6H, (CH₃)₂); 2,82 (д, 2H, J=7,2 Hz, CH₂); 10,7 (с, 1H, OH).

2.4 Препараты сравнения для верификации используемых моделей

Диклофенак (диклофенак натрия, Немофарм, Сербия) – нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (регистрационный номер № П N011648/03).

Доксорубин-Эбеве (доксорубин гидрохлорид, ЭБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х.НФГ.КГ, Австрия) – противоопухолевое средство, антибиотик антрациклинового ряда (регистрационный номер № П N015188/01).

Гемцитар (гемцитабин гидрохлорид, ЗАО «Биокад», Россия) – противоопухолевое средство, антиметаболит (регистрационный номер № ЛСР – 000299/10).

Эриус (дезлоратадин, Байер Биттерфельд ГмбХ, Германия) – антигистаминное средство (регистрационный номер № ЛП-(001060)-(РГ-RU)).

Преднизолон Буфус (преднизолон, Обновление Реневал ПФК АО, Россия) – противовоспалительное средство, синтетический глюкокортикостероид (регистрационный номер № ЛП-000945).

Субстанция доксорубин гидрохлорида (Sigma-Aldrich, США).

Субстанция циклофосфамида (Sigma-Aldrich, США).

2.5 Материалы

- автоматическое устройство для приготовления мазков крови V-SAMPLER (Vision, Австрия)
- адьювант Фрейнда полный (Sigma-Aldrich, США)
- актиметр инфракрасный Acti-track IR Actimeter (Panlab, Harvard Apparatus, Испания)
- альбумин (Albumin from chicken egg white, Sigma-Aldrich, США)
- аминокислоты для среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия)
- весы торсионные ВТ-500 (Завод «Госметр», СССР)
- гемцитабин (ЗАО «Биокад», Россия)
- гентамицин («ПанЭко», Россия)
- гепарин (ЭЛЬФА Лабораториз, Индия)
- гидроокись алюминия (Sigma, США)
- гипотонический раствор KCl (Валента-Фарм, Россия)
- дезлоратадин (Байер Биттерфельд ГмбХ, Германия)
- диклофенак (Немофарм, Сербия)
- диметилсульфоксид (ДМСО) (Биолот, Россия)
- диоксидин (Валента-Фарм, Россия)
- доксорубицин (ЭБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х.НФГ.КГ, Австрия)
- доксорубицина гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США)
- инкубатор CO₂ Galaxy 14 S (New Brunswick Scientific, Англия)
- колхицин (Acros Organics, Бельгия)
- компьютеризированной микроскопической системе МЕКОС-Ц2 (Мекос, Россия)
- микроскоп «Nikon Eclipse E200» (Nikon, Япония)
- микроскоп Standart-20 (Carl Zeiss, Германия)
- митомицин С (Mitomycin-C Kyowa, Япония)
- питательная среда RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Россия)
- преднизолон (преднизолон, Обновление Реневал ПФК АО, Россия)
- прибор-автомат для пробоподготовки мазков крови ЭМКОСТЕЙНЕР-АВТО АФОМК8-В-01 (ЭМКО, Россия)
- раствор йодистого пропидия с РНКазой А («BioInnlabs», Россия)

- раствор натрия хлорида для инфузий 0,9% (ОАО НПК “Эском”, Россия)
- счетчик клеток автоматический TC 20 (BIO RAD, Великобритания)
- спирт этиловый 90%
- трипановый синий 0,4 % (BIO RAD, Великобритания)
- центрифуга 5804R (Eppendorf, Германия)
- циклофосфамид (Sigma-Aldrich, США)
- планшетный ридер Varioskan Lux (TS, США)
- проточный цитометр лазерный BD FACSCanto II (Becton Dickinson and Company, США)
- установка Plantar Test (Hargreave’s Method, Ugo Basile, Италия)
- штангенциркуль двусторонний цифровой с глубиномером ШЦЦ-1-125-0.01 (Micron, Чехия)
- эмбриональная телячья сыворотка (Биолот, Россия)
- Cayman Chemical COX Colorimetric Inhibitor Screening Assay Kit (assay buffer – стоковый буфер, hemin - гемин, COX Colorimetric Assay COX-1 – фермент циклооксигеназа-1 бычий, COX Colorimetric Assay COX-2 – фермент циклооксигеназа-2 человеческий, arachidonic acid – арахидоновая кислота, potassium hydroxide – гидроксид калия, colorimetric substrate – субстрат для колориметрии TMPD.
- Multi-Analyte Flow Assay Kit (assay buffer – стоковый буфер, mouse IgE assay kit: mouse IgE capture bead B5 – полимерные флюоресцентные частицы, покрытые специфичными антителами к IgE, mouse IgE standart – стандарт для построения калибровочной кривой, mouse IgE detection antibody – антитела, связывающиеся с комплексом антиген-антитело, FITC beads – частицы с флуоресцеином, PE beads – частицы с фикоэритрином, SA-PE – стрептавидин, конъюгированный с фикоэритрином, wash buffer – промывочный буфер) (BioLegend, США)
- Mouse Th1/Th2 10plex Kit (assay buffer – стоковый буфер, anti-m. antibodies/biotin – антитела для конъюгирования с интерлейкинами, fluorescent beads coated with specific antibodies (an-ti-m. IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α Beads) – субпопуляции полимерных флюоресцентных частиц, покрытых специфичными антителами к каждому из интерлейкинов, SA-PE – стрептавидин, конъюгированный с фикоэритрином, Setup beads – полимерные

частицы для настройки параметров светорассеивания на проточном цитометре) (eBioscience, Австрия)

2.6 Методы оценки противоопухолевой и антиметастатической активности соединений

При выборе методов оценки противоопухолевой и антиметастатической активности использовали «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Глава 3, Часть 4. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005).

2.6.1 Модель злокачественной перевиваемой опухоли меланомы B16 *in vivo*

В качестве экспериментальной модели злокачественного роста была использована модель меланомы B16 *in vivo*, получен из лаборатории «Биоресурсная коллекция клеточных линий и первичных опухолей» ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России. Взвесь опухолевых клеток меланомы B16 имплантировали мышам подкожно в область подмышечной впадины 50 мг в 0,5 мл раствора Хэнкса на мышь. Прививочная доза составляла 5×10^6 клеток/мышь. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считали нулевым днем развития опухоли. В качестве позитивного контроля использовали доксорубин гидрохлорид (ЭБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х.Нфг.КГ, Австрия) – антрациклиновый антибиотик, интеркалятор ДНК, нарушающий ее матричную функцию и препятствующий диссоциации комплекса ДНК-топоизомераза II, что приводит к появлению многочисленных разрывов ДНК и гибели клетки. Доксорубин растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида и вводили однократно в/б в дозе 4 мг/кг на 2-й день развития опухоли (через 48 часов после прививки опухоли). СНК-411 растворяли в 1% растворе крахмала и в/б вводили в дозах 10 и 25 мг/кг в течение 14 дней со 2 по 15 дни развития меланомы B16. СНК-578 растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида, в/б вводили в дозах 10 и 25 мг/кг в течение 14 дней со 2 по 15 дни развития меланомы B16.

Животных рандомизировали в следующие группы:

Группа 1. Активный контроль мыши с меланомой В16, которым вводили 1% раствор крахмала в/б, n=10;

Группа 2. Мыши С57BL/6 с меланомой В16, которым вводили доксорубицин в дозе 4 мг/кг в/б, n=10;

Группа 3. Мыши С57BL/6 с меланомой В16, которым вводили СНК-411 в дозе 10 мг/кг в/б, n=10;

Группа 4. Мыши С57BL/6 с меланомой В16, которым вводили СНК-411 в дозе 10 мг/кг + доксорубицин в дозе 4 мг/кг в/б, n=10;

Группа 5. Мыши С57BL/6 с меланомой В16, которым вводили СНК-411 в дозе 25 мг/кг в/б, n=10.

Группа 6. Мыши С57BL/6 с меланомой В16, которым вводили СНК-578 в дозе 10 мг/кг в/б, n=10.

Группа 7. Мыши С57BL/6 с меланомой В16, которым вводили СНК-578 в дозе 25 мг/кг в/б, n=10.

Группа 8. Мыши С57BL/6 с меланомой В16, которым вводили СНК-578 в дозе 10 мг/кг + доксорубицин в дозе 4 мг/кг в/б, n=10;

2.6.2 Оценка противоопухолевой активности соединения в модели злокачественной перевиваемой опухоли меланомы В16 на мышях линии С57BL/6

Объем опухоли вычисляли после измерения 3 размеров по формуле:

$V = A \times B \times C$, где – «А», «В» и «С» – размеры опухоли. Измерения проводили на 11, 15 и 21 сутки развития опухоли.

Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО, \%} = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100\%,$$

где $V_{\text{контроля}}$ – средний объем опухолей в контрольной группе (мм³),

$V_{\text{опыта}}$ – средний объем опухолей в опытной группе (мм³).

ТРО рассчитывали на 11, 15 и 21 сутки развития опухоли

2.6.3 Оценка антиметастатического действия соединения в модели злокачественной перевиваемой опухоли меланомы В16

На 21-й день после вскрытия павших мышей метастазы в легких изучали под лупой с 8-кратным увеличением (Magnifier Lamp 8608 E-D ХВ с кольцевой люминесцентной подсветкой). По результатам рассчитывали среднее количество

метастазов в группе и степень поражения легких метастазами (%) по общепринятой шкале (Tarin & Price, 1979). Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) определяли по формуле:

$$\text{ИИМ} = ((A_k \times B_k) - (A \times B)) / (A_k \times B_k) \times 100\%,$$

где A и A_k - частота метастазирования в легких у мышей контрольной и опытной группы, соответственно;

B и B_k – среднее число метастазов в легких в контрольной и опытной группах, соответственно.

2.6.4 Модель злокачественной перевиваемой опухоли аденокарциномы молочной железы Ca755

В качестве позитивного контроля и препарата для изучения совместного действия с 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидином применяли гемцитабин (Гемцитар, Биокад, Россия).

В качестве экспериментальной модели злокачественного роста была выбрана аденокарцинома молочной железы Ca755. Опухолевые клетки аденокарциномы молочной железы Ca755 получены из лаборатории «Биоресурсная коллекция клеточных линий и первичных опухолей» ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России. Взвесь опухолевых клеток (50 мг в 0,5 мл раствора Хэнкса на мышь) аденокарциномы Ca755 имплантировали мышам подкожно в область подмышечной впадины. Стандартная прививочная доза составляла не менее 5×10^6 клеток/мышь. День подкожной прививки клеток считали нулевым днем развития опухоли.

Лиофилизат гемцитабина растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида и вводили внутривенно (в/в) в дозе 100 мг/кг на 2-ой день развития опухоли и в дозе 50 мг/кг на 9-й день развития опухоли. Суммарная доза 150 мг/кг гемцитабина является субтерапевтической, её выбрали с целью лимитирования гематотоксического действия. СНК-411 разводили в 1% растворе крахмала и вводили в/в в дозе 25 мг/кг. СНК-578 разводили в изотоническом растворе натрия хлорида и вводили в/в в дозе 10 мг/кг. Оба соединения вводили с 2-го по 15-ый день развития опухоли.

Животных рандомизировали в следующие группы:

Группа 1. Интактный контроль мыши C57BL/6 без опухоли n=10;

Группа 2. Активный контроль мыши C57BL/6 с аденокарциномой Ca755, которым вводили по 0,2 мл 1% раствора крахмала в/б, n=20;

Группа 3. Мыши C57BL/6 с аденокарциномой Ca755, которым вводили СНК-411 в дозе 25 мг/кг в/б, n=20;

Группа 4. Мыши C57BL/6 с аденокарциномой Ca755, которым вводили СНК-411 в дозе 25 мг/кг + гемцитабин (суммарная доза 150 мг/кг) в/б, n=20;

Группа 5. Мыши C57BL/6 с аденокарциномой Ca755, которым вводили СНК-578 в дозе 10 мг/кг в/б, n=20;

Группа 6. Мыши C57BL/6 с аденокарциномой Ca755, которым вводили СНК-578 в дозе 10 мг/кг + гемцитабин (суммарная доза 150 мг/кг) в/б, n=20;

Группа 7. Мыши C57BL/6 с аденокарциномой Ca755, которым вводили гемцитабин (суммарная доза 150 мг/кг) в/б, n=20.

2.6.5 Оценка противоопухолевой активности соединения в модели злокачественной перевиваемой опухоли аденокарциномы молочной железы Ca755

Объем опухоли вычисляли после измерения 3 размеров по формуле:

$V = A \times B \times C$, где – «А», «В» и «С» – размеры опухоли. Измерения проводили на 9, 16 и 21 сутки развития опухоли.

Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО, \%} = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100\%,$$

где $V_{\text{контроля}}$ – средний объем опухолей в контрольной группе (мм³),

$V_{\text{опыта}}$ – средний объем опухолей в опытной группе (мм³).

ТРО рассчитывали на 9, 16 и 21 сутки развития опухоли

На 22 день опыта группы разделяли на две части (по 10 животных в каждой), у одной части животных брали кровь на анализ, а вторую часть оставляли и продолжали наблюдение, чтобы оценить влияние соединений на продолжительность жизни. Для анализа выживаемости использовали метод Каплана-Майера. Увеличение продолжительности жизни вычисляли по формуле:

$$\text{УПЖ, \%} = ((\text{СПЖ}_{\text{опыта}} - \text{СПЖ}_{\text{контроля}}) / \text{СПЖ}_{\text{контроля}}) \times 100\%,$$

где СПЖ – средняя продолжительность жизни, дни.

2.6.6 Оценка влияния соединения на гематологические показатели мышей в модели злокачественной перевиваемой опухоли аденокарциномы молочной железы Ca755

Для изучения влияния 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина и гемцитабина на гематологические показатели крови на 22-ой день у 10 мышей интактного контроля и 60 животных из 2-7 экспериментальных групп брали кровь путем декапитации. Подсчет форменных элементов крови и гемоглобина у мышей проводили на автоматическом гематологическом анализаторе BC-2800 («MINDRAY», Китай). Соотношение различных видов лейкоцитов (окраска мазков крови по Романовскому) было измерено на компьютеризированной микроскопической системе МЕКОС-Ц2 (Мекос, Россия), микроскопе «Nikon Eclipse E200» (Nikon, Япония). Для стандартизации процесса приготовления мазков крови использовали автоматическое устройство для приготовления мазков крови V-SAMPLER (Vision, Австрия). Препараты крови фиксировали и окрашивали автоматически на приборе-автомате ЭМКОСТЕЙНЕР-АВТО АФОМК8-В-01 (ЭМКО, Россия).

2.6.7 Модель злокачественной перевиваемой опухоли аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ *in vivo*

В качестве экспериментальной модели злокачественного роста была использована модель опухоли аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ *in vivo*, АКАТОЛ получен из лаборатории «Биоресурсная коллекция клеточных линий и первичных опухолей» ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России. Взвесь опухолевых клеток АКАТОЛ имплантировали мышам подкожно в область подмышечной впадины по 10 мг в 0,1 мл раствора Хэнкса на мышь. Прививочная доза составляла не менее 1×10^6 клеток/мышь. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считали нулевым днем развития опухоли.

В качестве препарата сравнения и для совместного применения использовали доксорубицина гидрохлорид, который растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида и вводили в/б в дозе 5 мг/кг на 2-й и 4-й день развития опухоли (через 48 и 96 часов после прививки опухоли). СНК-411 растворяли в 1% растворе крахмала и *per os* вводили в дозе 25 мг/кг в течение 14 дней со 2 по 15 дни развития

аденокарциномы АКАТОЛ. СНК-578 растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида и в/б вводили в дозе 10 мг/кг в течение 14 дней со 2 по 15 дни развития аденокарциномы АКАТОЛ.

Животных рандомизировали в следующие группы:

Группа 1. Активный контроль мыши с аденокарциномой толстой кишки АКАТОЛ, которым вводили по 0,2 мл 1% раствор крахмала в/б, n=12;

Группа 2. Мыши BALB/c с аденокарциномой толстой кишки АКАТОЛ, которым вводили доксорубицин (суммарная доза 10 мг/кг) в/б, n=12;

Группа 3. Мыши BALB/c с аденокарциномой толстой кишки АКАТОЛ, которым вводили СНК-578 в дозе 10 мг/кг в/б, n=12;

Группа 4. Мыши BALB/c с аденокарциномой толстой кишки АКАТОЛ, которым вводили СНК-578 в дозе 10 мг/кг + доксорубицин (суммарная доза 10 мг/кг) в/б, n=12;

Группа 5. Мыши BALB/c с аденокарциномой толстой кишки АКАТОЛ, которым вводили СНК-411 в дозе 25 мг/кг per os + доксорубицин (суммарная доза 10 мг/кг) в/б, n=12;

Группа 6. Мыши BALB/c с аденокарциномой толстой кишки АКАТОЛ, которым вводили СНК-411 в дозе 25 мг/кг per os, n=12.

2.6.8 Оценка противоопухолевой активности соединения в модели злокачественной перевиваемой опухоли аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ

Объем опухоли вычисляли после измерения 3 размеров по формуле:

$V = A \times B \times C$, где – «А», «В» и «С» – размеры опухоли. Измерения проводили на 11, 15 и 21 сутки развития опухоли.

Противоопухолевый эффект регистрировали на 11, 15 и 21 сутки развития опухоли. Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

$\text{ТРО, \%} = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100\%$, где $V_{\text{контроля}}$ – средний объем опухолей в контрольной группе (мм³), $V_{\text{опыта}}$ – средний объем опухолей в опытной группе (мм³).

На 22 день опыта оставили на выживание по 10 мышей в каждой группе, чтобы оценить действие изучаемых соединений на увеличение средней продолжительности жизни (УПЖ). Для анализа выживаемости использовали метод Каплана-Майера.

Увеличение продолжительности жизни вычисляли по формуле:

$$\text{УПЖ, \%} = ((\text{СПЖ}_{\text{опыта}} - \text{СПЖ}_{\text{контроля}}) / \text{СПЖ}_{\text{контроля}}) \times 100\%,$$

где СПЖ – средняя продолжительность жизни, дни.

2.7 Методы оценки противовоспалительной, противоаллергической и антимуtagenной активности соединения

2.7.1 Системная реакция анафилаксии

Изучение действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина и препарата сравнения Эриус (дезлоратадин) на реакцию общей системной анафилаксии к овальбумину было проведено в опытах на 140 мышах линии BALB/c, мышам проводили двукратную иммунизацию с интервалом 2 недели подкожным введением овальбумина (Sigma-Aldrich, 100 мкг/мышь) в смеси с гидроокисью алюминия (Sigma-Aldrich, 5 мг/мышь) в объеме 0,2 мл. Дезлоратадин таблетки растирали в 1% крахмале и вводили в/б в дозе 1,3 мг/кг, (что соответствует дозе 10 мг для человека по Freireich et al., 1966). СНК-411 и СНК-578 растворяли в 1% растворе крахмала и вводили в/б.

Мышей распределили по 7 следующим группам:

Группа 1. Интактный контроль мыши BALB/c, n=20;

Группа 2. Активный контроль – мыши BALB/c, иммунизированные овальбумином, n=20;

Группа 3. Мыши BALB/c, иммунизированные овальбумином, которым вводили дезлоратадин в дозе 1,3 мг/кг в/б, n=20;

Группа 4. Мыши BALB/c, иммунизированные овальбумином, которым вводили СНК-411 в дозе 25 мг/кг в/б, n=20;

Группа 5. Мыши BALB/c, иммунизированные овальбумином, которым вводили СНК-411 в дозе 50 мг/кг в/б, n=20;

Группа 6. Мыши BALB/c, иммунизированные овальбумином, которым вводили СНК-578 в дозе 25 мг/кг в/б, n=20;

Группа 7. Мыши BALB/c, иммунизированные овальбумином, которым вводили СНК-578 в дозе 50 мг/кг в/б, n=20.

После второй иммунизации овальбумином в течение 7 дней мышам групп интактного и активного контроля вводили в/б по 0,2 мл физиологического раствора,

мышам опытных групп вводили СНК-411, СНК-578 и препарат сравнения дезлоратадин. Через 1 час после последнего введения препаратов мышам контрольных и опытных групп в ретроорбитальный синус вводили внутривенно овальбумин (по 100 мкг в 0,1 мл физиологического раствора) и оценивали уровень системной реакции анафилаксии. У иммунизированных овальбумином мышей развивалась анафилактическая реакция различной степени тяжести. Выделяли следующие степени выраженности анафилаксии:

- 1 (слабая) степень – угнетенное состояние, взъерошенность шерстного покрова,
- 2 (средняя) степень – угнетенное состояние, взъерошенность шерстного покрова, цианоз конечностей, дыхание поверхностное и учащенное, клонические судороги, парезы, параличи;
- 3 (тяжелая) степень – судороги, параличи, гибель в течение 60 минут, после чего производили вычисление анафилактического индекса по Weigle.

2.7.2 Мультиплексное исследование цитокинов в сыворотке крови мышей, иммунизированных овальбумином на модели системной реакции анафилаксии

Измерение содержания цитокинов и IgE в сыворотке крови мышей проводили на проточном цитометре BD FACSCanto II по методу мультиплексного определения флуоресцентных частиц (Mouse Th1/Th2 10plex Kit, eBioscience, Австрия), Multi-Analyte Flow Assay Kit (mouse IgE assay kit, BioLegend, США) согласно протоколу производителя.

Половину мышей экспериментальных групп выводили из эксперимента после окончания введения соединений для получения сыворотки крови. Забор крови у животных проводили путем декапитации по окончанию эксперимента, кровь центрифугировали с ускорением 16 000 g в течение 5 минут на центрифуге, образцы хранили при -30°C до исследования концентраций цитокинов. В основе анализа лежит принцип ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – связывающие микросферы с антителами к определенным цитокинам, добавляют к жидкости, содержащей исследуемые аналиты, после чего происходит образование комплекса «аналит-связывающее антитело». Далее добавляются биотинилированные детектирующие антитела, которые в свою очередь также связываются с аналитами. Полученный комплекс микросфера-аналит-детектирующее антитело дополнительно обрабатывается Стрептавидином-фикоэритрином. Фикоэритрин

возбуждается аргоновым лазером (480 нм) и испускает фотоны. Концентрация конкретного аналита определяется при сравнении со стандартной калибровочной кривой, построенной в том же анализе.

Процедура определения содержания цитокинов в сыворотке крови включает этапы:

1. Перед использованием реагенты нагревают до комнатной температуры (25 °C).
2. В каждую ячейку плашки вносят по 25 μ l буфера, в ячейки стандарта вносят по 25 μ l стандарта, в ячейки экспериментальных групп вносят по 25 μ l изучаемого образца.
3. Частицы встряхивают на вортексе в течение 30 секунд. В каждую ячейку плашки вносят по 25 μ l частиц.
4. Добавляют по 50 μ l биотинилированных антител во все ячейки.
5. Плашку закрывают с помощью наклейки и полностью покрывают её алюминиевой фольгой для защиты от попадания света. Затем плашку ставят на шейкер на 2 часа со скоростью 500 оборотов в минуту при комнатной температуре.
6. Плашку центрифугируют при скорости 1050 оборотов в минуту в течение 5 минут.
7. Сразу после центрифугирования, супернатант сливают быстрым движением (резко поворачивая плашку вверх дном и встряхивая её одним непрерывным и сильным движением).
8. Вносят 100 μ l буфера в каждую ячейку.
9. Добавляют 50 μ l SA-PE (стрептавидин-фикоэритрин) в каждую ячейку.
10. Закрывают плашку с помощью новой наклейки и оборачивают алюминиевой фольгой. Ставят на шейкер на 1 час со скоростью 500 оборотов в минуту при комнатной температуре.
11. Плашку центрифугируют при скорости 1050 оборотов в минуту в течение 5 минут.
12. Сразу после центрифугирования, супернатант сливают быстрым движением (резко поворачивая плашку вверх дном и встряхивая её одним непрерывным и сильным движением).
13. Вносят 200 μ l буфера в каждую ячейку.

14. Переносят содержимое ячеек в пробирки для цитометрии, добавляют 300 µl буфера в каждую пробирку.

15. Регистрируют результаты на проточном цитометре.

16. Обрабатывают данные, полученные на цитометре, в ПО, предоставленном производителем.

2.7.3 Экссудативный отек на полный адъювант Фрейнда

Изучение действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в сравнении с преднизолоном на ПАФ (полный адъювант Фрейнда)-индуцированный отек стопы и скакательного сустава крыс было проведено на 60 аутбредных самцах крыс массой 160-180 г. Преднизолон, СНК-411 и СНК-578 вводили в/б 2 раза за 24 часа и 2 часа до введения ПАФ, преднизолон вводили в дозе 10 мг/кг, СНК-411 в дозах 25 мг/кг и 40 мг/кг, СНК-578 – в дозах 10 и 25 мг/кг. Животных рандомизировали в следующие группы:

Группа 1. Активный контроль – крысы Wistar, которым вводили ПАФ 0,1 мл в стопу, n=10;

Группа 2. Крысы Wistar с ПАФ, которым вводили преднизолон в/б в дозе 10 мг/кг за 24 часа и за 2 часа до введения ПАФ, n=10;

Группа 3. Крысы Wistar с ПАФ, которым вводили СНК-578 в/б в дозе 10 мг/кг за 24 часа и за 2 часа до введения ПАФ, n=10;

Группа 4. Крысы Wistar с ПАФ, которым вводили СНК-578 в/б в дозе 25 мг/кг за 24 часа и за 2 часа до введения ПАФ, n=10;

Группа 5. Крысы Wistar с ПАФ, которым вводили СНК-411 в/б в дозе 25 мг/кг за 24 часа и за 2 часа до введения ПАФ, n=10;

Группа 6. Крысы Wistar с ПАФ, которым вводили СНК-411 в/б в дозе 40 мг/кг за 24 часа и за 2 часа до введения ПАФ, n=10.

Отек стопы и скакательного сустава регистрировали штангенциркулем цифровым ШЦЦ-1-125 (Micron, Чехия) через 24 часа после субплантарного введения 0,1 мл ПАФ в правую лапу.

2.7.4 Исследование противовоспалительной, обезболивающей активности и влияния соединения на двигательную активность животных и их гематологические показатели на модели адьювантного артрита

Исследование проводили на 70 самцах крыс линии Wistar массой 160-180 г. Животным вводили в левую лапу по 0,1 мл ПАФ. На 10 день опыта животных, после образования у крыс отека скакательного сустава правой лапы (признак развития адьювантного артрита), распределяли по группам и в течение 14 дней вводили в/б СНК-411, растворенный в 1% растворе крахмала, СНК-578, растворенный в изотоническом растворе натрия хлорида и диклофенак, растворенный в растворе натрия хлорида (Nemofarm, Сербия). Животные были рандомизированы в следующие группы:

Группа 1. Интактный контроль, n=10;

Группа 2. Активный контроль – крысы Wistar, которым в левую стопу ввели ПАФ, n=10;

Группа 3. Крысы Wistar с адьювантным артритом, которым вводили диклофенак в дозе 5 мг/кг в/б, n=10;

Группа 4. Крысы Wistar с адьювантным артритом, которым вводили в/б СНК-411 в дозе 25 мг/кг в/б, n=10;

Группа 5. Крысы Wistar с адьювантным артритом, которым вводили СНК-411 в дозе 40 мг/кг в/б, n=10;

Группа 6. Крысы Wistar с адьювантным артритом, которым вводили СНК-578 в дозе 10 мг/кг в/б, n=10;

Группа 7. Крысы Wistar с адьювантным артритом, которым вводили СНК-578 в дозе 25 мг/кг в/б, n=10.

Отек стопы и скакательного сустава регистрировали штангенциркулем цифровым ШЦЦ-1-125 (Micron, Чехия) на 1, 10, 15, 19 и 24 дни опыта. На 15-е и 24-е сутки после введения ПАФ у крыс оценивали выраженность термической гипералгезии в подошвенном тесте на установке Plantar Test (Hargreave's Method, Ugo Basile, Италия). Животных помещали по отдельности в пластиковые камеры (20×10×14 см) на стеклянной платформе аппарата и в течение 15 минут адаптировали к условиям установки. Интенсивность ИК-излучения была равной 66, что соответствовало повышению температуры воздействия от 40 до 50 °С в

течение 10 секунд. Регистрировали латентный период (ЛП) отдергивания задних лап в ответ на подачу сфокусированного луча инфракрасного света в секундах. Выраженность термической гиперчувствительности у крыс с вызванным введением ПАФ воспалительным процессом оценивали по снижению латентного периода отдергивания задних лап животных в ответ на подачу сфокусированного луча инфракрасного света по сравнению с соответствующими показателями группы крыс без экспериментальной патологии. На инфракрасном актиметре [Acti-track IR Actimeter (Panlab, Harvard Apparatus, Испания)] на 14 и 22 сутки определяли пройденное расстояние и количество подъемов в стойку. В конце опыта, у крыс были измерены масса тела, тимуса и селезенки (весы торсионные ВТ-500, Российская Федерация). На 25 сутки у крыс контрольных и опытных групп брали кровь из хвостовой вены путем ампутации кончика хвоста. Влияние 14-ти дневного введения 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина и диклофенака у самцов крыс на систему крови оценивали по следующим гематологическим показателям периферической крови: количеству гемоглобина, эритроцитов, среднему объему эритроцитов, среднему содержанию гемоглобина в эритроцитах, средней концентрации гемоглобина в эритроците. Подсчет форменных элементов крови и гемоглобина у мышей проводили на автоматическом гематологическом анализаторе ВС-2800, производитель «MINDRAY», Китай. Для стандартизации процесса приготовления мазков крови использовали автоматическое устройство для приготовления мазков крови V-SAMPLER (Австрия). Препараты крови фиксировали и окрашивали автоматически на приборе-автомате ЭМКОСТЕЙНЕР-АВТО (Россия), АФОМК8-В-01 (Россия).

2.7.5 Оценка генотоксичности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578)

Исследование выполнено на половозрелых самцах мышей-гибридов F1 СВАхС57В1/6, массой 22-24 г, в возрасте 6-8 недель, полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая», по 5 животных в каждой контрольной и экспериментальной группах.

Соль СНК-578 растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида при температуре 25 °С и вводили per os.

Метод учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей

Модельный мутаген и соединения вводили одновременно на срок 24 часа. Во всех вариантах экспериментов за 2,5 часа до забоя животным вводили колхицин из расчета 4 мг/кг с целью подавления формирования ахроматинового веретена клеточного деления и накопления метафаз.

Цитогенетические препараты костного мозга бедренных костей готовили стандартным суховоздушным методом. Забой животных осуществляли смещением шейных позвонков. Максимально быстро выделяли бедренные кости, срезали эпифизы и вымывали клетки костного мозга гипотоническим раствором (0,55% KCl), предварительно подогретым до 37 °С. После инкубации при 37 °С в течение 15 минут клеточную взвесь центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин (ELMI CM-6MT). Супернатант сливали, осадок ресуспендировали и добавляли 3 мл предварительно охлажденного фиксатора, состоящего из смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1). Клетки инкубировали 10 минут в холодильнике. Далее после повторного центрифугирования проводили смену фиксатора (3 мл). После этого клетки инкубировали в холодильнике еще 20 минут. Взвесь вновь центрифугировали, удаляли супернатант, осадок ресуспендировали в 0,5 мл вновь добавленного фиксатора и наносили на предварительно обезжиренные и охлажденные стекла, которые высушивали в пламени спиртовой горелки.

Окраску производили азур-эозином. Состав красителя включал: 5 частей азура (0,1%), 2 части эозина (0,1%), 10 частей дистиллированной воды. Время окраски – 20 мин.

Цитогенетический анализ проводили на микроскопе Standart-20 (Carl Zeiss, Германия) при маслоиммерсионном увеличении 10x100. Учитывали клетки с ахроматическими пробелами (гепами), одиночными и парными фрагментами хромосом и обментами различного типа (Savage J.R., 1976). В отдельную категорию (клетки с множественными повреждениями) выделяли метафазы, имеющие более пяти хромосомных повреждений. В каждой серии экспериментов использовали по 5 животных, от каждого животного анализировалось по 100 метафаз.

Статистическую обработку (угловое преобразование Фишера) проводили путем сравнения долей aberrантных метафаз между группами.

2.8 Методы исследования механизма действия

2.8.1 Определение ингибирующей активности

2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридина в виде соли (СНК-578) в отношении двух изоформ фермента ЦОГ-1 и ЦОГ-2

Метод основан на колориметрической регистрации активности пероксидазного компонента циклооксигеназы. Пероксидазная активность измеряется с помощью регистрации появления окисленного N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамина (TMPD, реагент Вурстера) на длине волны 590 нм с помощью набора COX Colorimetric Inhibition Assay Kit (№70150), производитель Cayman Chemical, USA.

СНК-578 растворяли в дистиллированной воде при температуре 25 °С. SC-560 и DUP-697 растворяли в DMSO при температуре 25 °С.

СНК-578 изучали в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ.

1. В ячейки фоновой активности вносят 160 μ л буфера (0,1 М трис(гидроксиметил)аминометан, pH 8) и 10 μ л гемина.

2. В ячейки 100% начальной активности вносят 150 μ л буфера, 10 μ л гемина и 10 μ л фермента (ЦОГ-1 или ЦОГ-2).

3. Вносят 10 μ л ингибитора в ячейки ингибиторов и 10 μ л растворителя (который был использован для растворения ингибиторов, в данном исследовании – дистиллированная вода и DMSO) в ячейки 100% начальной активности и фоновой активности, смешивают пипетированием. В качестве активного контроля используются соединения SC-560 (селективный ингибитор ЦОГ-1) и DUP-697 (селективный ингибитор ЦОГ-2).

4. Инкубируют в течение 5 минут при температуре 25 °С.

5. Добавляют 20 μ л раствора колориметрического субстрата (тетраметил-п-фенилендиамин дигидрохлорид, реагент Вурстера) во все используемые ячейки.

6. Быстро добавляют 20 μ л арахидоновой кислоты во все используемые ячейки и смешивают пипетированием.

7. Считывают поглощение на длине волны 590 нм после 2 минут инкубирования с арахидоновой кислотой.

8. Анализ данных проводят по инструкции производителя. Из показателей 100% начальной активности и ингибиторов вычитают показатели ячеек фоновой

активности. Для расчета ингибирования используют формулу $(100\% \text{ начальная активность} - \text{активность в ячейках ингибиторов}) / 100\% \text{ начальная активность}$, результат выражают в процентах. С помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 рассчитывали IC50 (концентрацию ингибитора, снижающую активность фермента ЦОГ-1/ЦОГ-2 на 50%) и рассчитывают индекс селективности.

2.8.2 Исследование влияния 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578) на клеточный цикл Т-лимфобластной лейкемии человека (Jurkat)

В качестве объекта исследования была использована опухолевая клеточная линия Jurkat («Т-лимфобластная лейкемия человека») из клеточного банка ФГБНУ «НИИ Общей Патологии и Патофизиологии».

Клетки опухолевой линии размораживали и культивировали с соблюдением условий стерильности в полной питательной среде RPMI-1640 с глутамином («ПанЭко», Россия), 10% эмбриональной сыворотки телят («Биолот», Россия), подвергнутой инактивации в течение 30 мин при температуре 56 °С, с добавлением гентамицина («ПанЭко», Россия) и аминокислот для среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) в полуоткрытой системе при температуре 37 °С в атмосфере 5%-го CO₂ до получения необходимого количества клеток. Для постановки эксперимента использовали культуры, которые содержали 95% и более жизнеспособных лимфобластных клеток линии Jurkat. Оценку данного параметра проводили методом микроскопии, используя 0,4%-й раствор трипанового синего (Serva, США).

Для анализа клетки были разделены на группы:

1. Интактные клетки Jurkat
2. Клетки Jurkat с доксорубицином в концентрации 10⁻⁵ М
3. Клетки Jurkat СНК-578 в концентрации 10⁻⁴ М
4. Клетки Jurkat СНК-578 в концентрации 10⁻⁵ М

Клетки в питательной среде вносили на двенадцатилуночный планшет по 300000 клеток в каждую лунку. Затем в лунки вносили цитостатик доксорубицина гидрохлорид в концентрации 10⁻⁵ М в виде раствора в среде или СНК-578 в концентрации 10⁻⁴ М или 10⁻⁵ М в виде раствора в среде и помещали в CO₂-инкубатор на 24 ч или 48 ч. Каждая группа дублировалась и эксперимент повторяли дважды. После инкубации клетки дважды отмывали 0,01 М

натрий-фосфатным буфером ($\text{pH} = 7,4$) и фиксировали в 70% охлажденном этаноле. На следующий день после фиксации клетки центрифугировали 5 минут с ускорением 220 g, сливали надосадочную жидкость и вносили по 500 мкл раствора йодистого пропидия с РНКазой А («BioInnlabs», Россия), после чего оставляли в темном месте на окрашивание в течение 30 минут. После окрашивания записывали по 25000 событий на пробу на проточном цитометре BD FACSCanto II. Анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo 10.5.

2.9 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения STATISTICA 13.5. Проверка на нормальность распределения проводилась с применением критерия Шапиро-Уилка. Все регистрируемые характеристики животных представлены в таблицах в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$) либо медианы и квартилей Me ($Q_1; Q_3$). Для проверки гипотезы об однородности групп исследования с нормальным распределением в исследуемой популяции проводили тестирование отсутствия различий между группами при помощи t-критерия Стьюдента. Оценку гомогенности дисперсий проводили по тесту Левена. Значимость влияния факторов при гомогенной дисперсии определялась с помощью дисперсионного анализа ANOVA, с последующей обработкой методом множественных сравнений по Тьюки или по тесту Данетта. В случае распределения, отличающегося от нормального, для сравнения показателей использовались непараметрический критерий Манна–Уитни. Множественные сравнения непараметрических данных проводили с помощью теста Краскила–Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением по тесту Данна. Анализ выживаемости проводился с использованием метода Каплана–Майера, для оценки достоверности различий между кривыми выживаемости использовался F-критерий Кокса. Для сравнения межгрупповых различий параметров, выраженных в номинальной шкале, использовали угловое преобразование Фишера. Результаты считались статистически достоверными, если значение p было меньшим или равным 0,05.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Оценка противоопухолевой и антиметастатической активности

2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина

3.1.1 Исследование противоопухолевой и антиметастатической активности

основания СНК-411 и соли СНК-578 и их сочетанного применения с доксорубицином на модели меланомы В16 в опытах на мышах линии С57ВL/6

Изучено влияние СНК-411, СНК-578 и доксорубицина на рост и метастазирование меланомы В16 на мышах линии С57ВL/6. СНК-411, СНК-578 вводили в течение 14 дней в/б в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг, доксорубицин вводили однократно в/б в дозе 4 мг/кг.

После окончания курсового введения основания СНК-411 в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг (которые соответствуют дозам 12 мг/кг и 30 мг/кг СНК-578) и в сочетании с однократным введением доксорубицина статистически значимого торможения роста опухоли на 21 день развития меланомы В16 в опытных группах не обнаружено (таблица 1). Максимальный противоопухолевый эффект (ТРО=58,2%) получен на 11 сутки после применения основания СНК-411 в дозе 10 мг/кг с доксорубицином.

Влияние 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде основания (СНК-411) на процесс метастазирования в легких мышей оценивали на 21 сутки после инокуляции меланомы В16 и эвтаназии животных. Частота метастазирования у животных контрольной группы составила 100%. В контроле у мышей выявили метастазы различных размеров (таблица 2).

Таблица 1 – Влияние СНК-411 и его сочетанного применения с доксорубицином на рост меланомы В16

Группы, n = 10	Объем опухоли, мм ³		
	11 сутки	15 сутки	21 сутки
Активный контроль	896±75,1	2795±597,7	5036,9±643,3
Доксорубицин 4 мг/кг	754,8±42,6	2169±399,5	3160,8±647,6
СНК-411 10 мг/кг	861,6±145,8	1781±469,4*	5185,5±554,9
СНК-411 10 мг/кг + Доксорубицин 4 мг/кг	374,9±115,8*	1752±166,2	4779,3±545,4
СНК-411 25 мг/кг	785,3±90,3	2400±390,5	3926±754,3
Группы, n ≥ 9	Торможение роста опухоли, %,		
Доксорубицин 4 мг/кг	11 сутки	15 сутки	21 сутки
	15,8%	22,4%	37,25%
СНК-411 10 мг/кг	3,8%	36,3%	-
СНК-411 10 мг/кг + Доксорубицин 4 мг/кг	58,2%	37,3%	5,11%
СНК-411 25 мг/кг	12,4%	14,1%	22,05%

Примечания: n – количество животных в группе;

* – p < 0,05 по сравнению с контрольной группой, критерий Данетта.

При 14-дневном в/б введении в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг, а также с сочетанным применением однократного в/б введения доксорубицина в дозе 4 мг/кг СНК-411 демонстрировало антиметастатическую активность (таблица 2). Ингибирование метастазирования при введении СНК-411 в дозе 10 мг/кг составило 72 %, при введении в дозе 25 мг/кг метастазирование снижалось на 82,9%. При сочетанном применении СНК-411 с доксорубицином ИИМ составил 97,1%, у 50% мышей этой группы на 21 день развития меланомы В16 метастазы в легких не были выявлены.

Таблица 2 – Влияние СНК-411 и его сочетанного применения с доксорубицином на метастазирование меланомы В16

Группы, n=10	Среднее число метастазов (M±m)	Степень поражения легких метастазами, %						ИИМ, %, на 21 сутки развития опухоли
		Низкий потенциал колонизации легких			Высокий потенциал колонизации легких			
		0	1	2	3	4	5	
Активный контроль	11,4±1,2	-	40	20	-	20	20	-
Доксорубицин 4 мг/кг	3,3±1,2*	33	50	-	-	17	-	80,5
СНК-411 10 мг/кг	3,8±1,7*	17	67	-	-	17	-	72,0
СНК411 10 мг/кг + Доксорубицин 4 мг/кг	0,7±0,3**	50	33	-	-	17	-	97,1
СНК-411 25 мг/кг	3,1±1,3**	38	50	-	-	13	-	82,9

Примечания: n – количество животных в группе;

* – p < 0,05 по t-критерию Стьюдента в сравнении с контролем;

** – p < 0,01 по t-критерию Стьюдента в сравнении с контролем.

При курсовом в/б введении водорастворимой соли СНК-578 в дозе 10 мг/кг в течение 14 дней мышам С57BL/6 достоверного снижения роста опухоли во все сроки наблюдения (11, 15 и 21 сутки) не обнаружено (таблица 3). Курсовое введение доксорубицина тормозило рост опухоли во все сроки наблюдения, ТРО на 21 день составило 33%, однако полученные данные показали статистически значимой разницы с контролем. Сочетанное курсовое в/б введение водорастворимой соли СНК-578 в дозе 10 мг/кг и однократное в/б введение доксорубицина в дозе 4 мг/кг выявило достоверное уменьшение роста опухоли по сравнению с группой активного контроля, не получавшей лечения, ТРО на 21 день развития меланомы В16 достигал 34%. При введении СНК-578 в дозе 25 мг/кг объем опухоли был в 1,6 раза достоверно ниже по сравнению с контролем на 11 день развития опухоли.

Влияние водорастворимой соли СНК-578 на процесс метастазирования в легких мышей оценивали на 21 сутки после инокуляции меланомы В16 и эвтаназии животных. После вскрытия метастазы в легких мышей изучали под лупой с 8-ми

кратным увеличением. Частота метастазирования у животных контрольной группы составила 100%. В контроле у мышей выявили метастазы различных размеров и сливные узлы из метастазов (таблица 4). Согласно полученным данным, 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин в виде соли (СНК-578) обладает выраженной антиметастатической активностью в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг при монотерапии и при сочетанном применении с доксорубицином в дозе 4 мг/кг (таблица 4). Ингибирование метастазирования при введении СНК-578 в дозе 10 мг/кг составило 75,8%, в дозе 25 мг/кг – 92,3%. При введении СНК-578 в дозе 25 мг/кг и при сочетанном применении СНК-578 в дозе 10 мг/кг с доксорубицином метастазы в легких были только 1 степени или отсутствовали. Наибольший антиметастатический эффект был обнаружен при сочетанном в/б введении водорастворимой соли СНК-578 в течение 14 дней в дозе 10 мг/кг и однократном введении доксорубицина в дозе 4 мг/кг. У 70% мышей метастазы отсутствовали, у 30% мышей было обнаружено по 1, 2 и 3 очень мелких метастаза, ИИМ составил 98,9%.

Таблица 3 – Влияние СНК-578 и его сочетанного применения с доксорубицином на рост меланомы В16

Группы, n = 10	Объем опухоли меланомы, мм ³			ТРО, % на 21 сутки развития опухоли
	11 сутки	15 сутки	21 сутки	
Активный контроль	869,7±68,7	2752,5±273,9	4709,4±647,5	-
Доксорубицин 4 мг/кг	754,0 ±42,6	2169,7±399,5	3160,8±647,6	33%
СНК-578 10 мг/кг	716,1±167,8	2281,2±126,1	4675,5±775,0	-
СНК-578 10 мг/кг + доксорубицин 4 мг/кг	315,2±95,5*	1206,1±162,6*	3113,4±274,7*	34%
СНК-578 25 мг/кг	549,0±113,6*	2082,9±304,8	3265,3±325,2	31%

Примечания: n – количество животных в группе;

*- p<0,05 по сравнению с контрольной группой, критерий Данетта.

Таблица 4 – Влияние СНК-578 и его сочетанного применения с доксорубицином на метастазирование меланомы В16

Группы, n=10	Среднее число метаст. (M±m)	Степень поражения легких метастазами, %						ИИМ, % на 21 сутки развития опухоли
		Низкий потенциал колонизации легких		Высокий потенциал колонизации легких				
		0	1	2	3	4	5	
Активный контроль	18,1±3,1	-	14,3%	50%	-	35,7%	-	-
Доксорубицин 4 мг/кг	3,6±0,8*	14,3%	71,5%	7,1%	-	7,1%		83,0%
СНК-578 10 мг/кг	5,0±1,5*	12,5%	75,0%	12,5%	-	-	-	75,8%
СНК-578 10мг/кг + доксорубицин 4 мг/кг	0,6±0,3*	66,7%	33,3%	-	-	-	-	98,9%
СНК-578 25 мг/кг	1,8±0,7*	22,2%	77,8%	-	-	-	-	92,3%

Примечания: n – количество животных в группе;

* – $p < 0,01$ в сравнении с контрольной группой по t-критерию Стьюдента.

Таким образом, 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина гидрохлорид (СНК-578) при сочетанном применении с доксорубицином значительно тормозит рост опухоли на 11, 15 и 21 сутки ее развития, обладает выраженным антиметастатическим действием при курсовом введении в дозах 10 и 25 мг/кг как отдельно, так и в сочетании с доксорубицином.

Водорастворимая соль СНК-578 также, как и малорастворимое основание СНК-411 обладают сходным антиметастатическим действием в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг на модели меланомы В16, но при этом обе формы не вызывают статистически значимого ТРО на 7 день после окончания введения.

Полученные результаты опубликованы

- в статьях с соавторами:

1. Никитин, С.В. Синтез, противоопухолевая и антиметастатическая активность производного 5-оксипиримидина / С.В. Никитин, Л.П. Коваленко, А.Г. Ребеко, **Р.В. Журиков** [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – № 8 (53). – С. 20-23.

2. **Журиков, Р.В.** Влияние производного 5-оксипиримидина на рост и метастазирование меланомы B16 у мышей линии C57BL/6 / **Р.В. Журиков, Л.П. Коваленко, С.В. Никитин** [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2021 – № 3 (20). – С. 66-72;

- в тезисах с соавтором:

Журиков, Р.В. Изучение противоопухолевой и антиметастатической активности производного 5-оксипиримидина (СНК-411) / **Р.В. Журиков, С.В. Никитин** // Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора Никулина «Достижения современной фармакологической науки» под ред. Е.Н. Якушевой. – 2018, С. 49-50.

3.1.2 Исследование противоопухолевой активности основания СНК-411 и соли СНК-578, а также их влияния на выживаемость мышей BALB/c с аденокарциномой толстой кишки АКАТОЛ

Изучено влияние СНК-411, СНК-578 и доксорубицина на рост и метастазирование аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ на мышцах линии BALB/c. СНК-411 вводили в течение 14 дней *per os* в дозе 25 мг/кг, СНК-578 вводили в течение 14 дней в/б в дозе 10 мг/кг, доксорубицин вводили двукратно в/б в дозе 5 мг/кг.

Двухнедельное введение СНК-411 *per os* и СНК-578 в/б совместно с двукратным введением доксорубицина приводит к ингибированию ТРО на всех сроках наблюдения (таблица 5).

Таблица 5 – Влияние СНК-411, СНК-578 и сочетанного применения с доксорубицином на рост аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ

Группы, n=12	Средний объем опухоли, мм ³							
	9 сутки	ТРО %	15 сутки	ТРО %	21 сутки	ТРО %	28 сутки	ТРО %
Контроль	201,2±36,3		1916,4±380,4		3252±804,5		6015,4±1201	
Доксорубицин 2×5 мг/кг	2,5±1,8*	98,8	108,5±41,8*	94,3	595,2±194,2*	81,7	1848,6±689,4*	69,3
СНК-411 25 мг/кг	73,4±21,1*	63,5	464,3±102,5*	75,8	845,5±179,5*	74,0	1984,9±313*	67
СНК-411 25 мг/кг + доксорубицин	0,28±0,28*	99,9	139,3±76,3*	92,3	210,2±84,6*	92,7	2109,3±640,7*	65
СНК-578 10 мг/кг	132,8±18,3	34,0	508,5±107,7*	73,5	853,5±130,2*	73,5	2163±302,4*	64
СНК-578 10 мг/кг + доксорубицин	4,92±3,8*	97,6	102,6±34,5*	94,7	271,9±116,3*	91,6	1024,8±271,2*	83

Примечания: n – количество животных в группе;

* – $p < 0,05$ по тесту Манна-Уитни по сравнению с контролем.

Через 7 суток после окончания введения комбинации СНК-411 в дозе 25 мг/кг и доксорубицина ТРО составило 92,7% ($p < 0,05$), через 14 суток – 65% ($p < 0,05$). Комбинация СНК-578 в дозе 10 мг/кг и доксорубицина на 7-е сутки после окончания введения вызвала ТРО на 91,6% ($p < 0,05$), а через 14 суток на 64% ($p < 0,05$). СНК-411 в дозе 25 мг/кг вызывало ТРО на всех сроках наблюдения: на 7-й день после окончания – 74% ($p < 0,05$), а на 14-й день – 83% ($p < 0,05$).

При введении СНК-578 статистически достоверное ТРО отмечалось на 15, 21 и 28 сутки наблюдения. Через 7 дней после окончания введения СНК-578 в дозе 10 мг/кг ТРО было 73,5% ($p < 0,05$), а на 14-й день – 64% ($p < 0,05$).

СПЖ мышей с опухолью АКАТОЛ была 58,1 суток (таблица 6). При двукратном введении доксорубицина в дозе 5 мг/кг 2 мыши из 12 погибли в связи с токсическим действием доксорубицина. При сочетанном применении доксорубицина с СНК-411 и СНК-578 животные не погибали. Двукратное введение доксорубицина не приводило к увеличению СПЖ животных-опухоленосителей, не смотря на ТРО, что может объясняться токсическим воздействием доксорубицина. Наибольшее УПЖ вызывало двухнедельное введение СНК-578 в дозе 10 мг/кг, СПЖ составила 72,8 суток, УПЖ – 25% ($p < 0,05$). УПЖ при введении СНК-411 в

дозе 25 мг/кг составило 21%, СПЖ была 70,5 суток ($p < 0,05$). СПЖ животных, у которых было сочетанное применение доксорубицина и СНК-578, составила 67,3 суток ($p < 0,05$).

Таблица 6– Влияние СНК-411 и СНК-578 и их сочетанного применения с доксорубицином на выживаемость мышей с аденокарциномой толстой кишки АКАТОЛ

Группа, n=12	Средняя продолжительность жизни, суток	УПЖ, %
Активный контроль	58,1	
Доксорубицин	57,5	-1%
СНК-411 25 мг/кг	70,5*	21%
СНК-411 25 мг/кг + доксорубицин	58	-0,1%
СНК-578 10 мг/кг	72,8*	25%
СНК-578 10 мг/кг + доксорубицин	67,3*	15%

Примечания: n – количество животных в группе;

* - $p < 0,05$ по F-тесту Кокса по сравнению с активным контролем.

Медиана выживаемости у животных активного контроля составила 60 дней, при введении основания (СНК-411) в дозе 25 мг/кг per os – 66 дней, а при введении соли (СНК-578) в дозе 10 мг/кг в/б – 72 дня. В связи с токсичностью доксорубицина медиана выживаемости при введении основания (СНК-411) с доксорубицином составила 53 дня, при введении и его соли (СНК-578) с доксорубицином – 70 дней (рисунок 9). Таким образом, полученные данные показывают, что 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин в виде основания (СНК-411) и соли (СНК-578) при курсовом 14-тидневном в/б введении обладает способностью к торможению роста аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ, а также приводит к УПЖ. Наиболее выраженное ТРО отмечалось при введении комбинаций СНК-411 и СНК-578 с двукратным введением доксорубицина в дозе 5 мг/кг на 7-ые сутки после окончания введения препаратов.

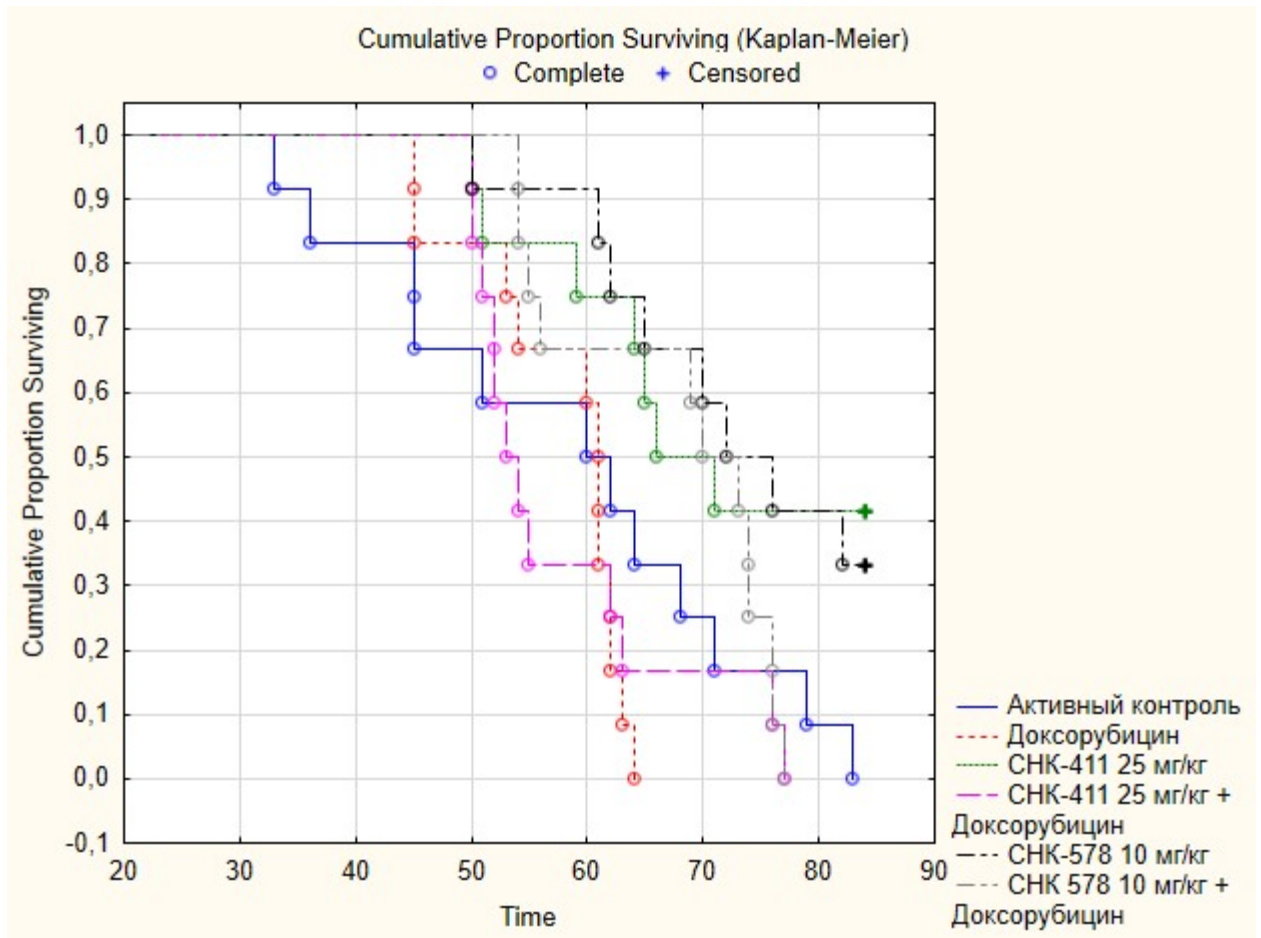


Рисунок 9 – Влияние СНК-411 и СНК-578 и их комбинаций с доксорубицином на выживаемость мышей с аденокарциномой толстой кишки АКАТОЛ

В данном эксперименте основание СНК-411 вводили *per os*, вероятно, оно подвергается протонированию в желудке с образованием соли (СНК-578) вследствие низкого рН желудочного сока. Водорастворимая соль СНК-578 в дозе 10 мг/кг также, как и малорастворимое основание СНК-411 в дозе 25 мг/кг (в дозе эквивалентной 30 мг/кг соли СНК-578) обладают примерно одинаковым антипролиферативным действием на модели аденокарциномы АКАТОЛ, а также примерно равнозначно увеличивают продолжительность жизни.

Полученные результаты опубликованы в тезисах с соавторами:

Коваленко, Л.П. Противоопухолевые и антиметастатические свойства производных 5-оксипиримидина и их влияние на содержание проонкогенных цитокинов в сыворотках крови животных-опухоленосителей. / Л.П. Коваленко, Р.В. Журиков, Л.Ф. Зайнуллина [и др.] // Материалы I Всероссийской научно-

практической конференции «Достижения и перспективы экспериментальной фармакологии в онкологии и радиационной медицине» (1 марта 2024 года). Обнинск: МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. – 2024 – С.32.

3.1.3 Исследование противоопухолевой активности основания СНК-411 и соли СНК-578, а также их влияния на выживаемость и гематологические показатели мышей C57BL/6 с аденокарциномой молочной железы Ca755

Изучено влияние СНК-411, СНК-578 и гемцитабина на рост аденокарциномы молочной железы Ca755 на мышах линии C57BL/6. СНК-411 вводили в течение 14 дней в/б в дозе 25 мг/кг, СНК-578 вводили в течение 14 дней в/б в дозе 10 мг/кг, гемцитабин вводили двукратно в/б в суммарной дозе 150 мг/кг.

Установлено, что у мышей, которым вводили малорастворимое основание СНК-411 в дозе 25 мг/кг в/б или водорастворимую соль СНК-578 в дозе 10 мг/кг в/б, содержание гемоглобина и эритроцитов не имели значимых различий с активным контролем и были ниже показателей интактного контроля ($p < 0,05$) (таблица 7). У мышей после двукратного введения гемцитабина в/б в суммарной дозе 150 мг/кг содержание гемоглобина снизилось на 25%, а эритроцитов на 32% по сравнению с интактным контролем.¹ В крови мышей, которым вводили СНК-411 в дозе 25 мг/кг и СНК-578 в дозе 10 мг/кг в сочетании с гемцитабином в/б, содержание гемоглобина и эритроцитов значимо не отличалось от уровня интактного контроля. В группе совместного введения СНК-411 с гемцитабином содержание гемоглобина повысилось на 62%, а количество эритроцитов на 78% по сравнению с активным контролем. В группе совместного введения СНК-578 с гемцитабином содержание гемоглобина повысилось на 69%, а количество эритроцитов на 86% по сравнению с активным контролем. Значимые различия в содержании лейкоцитов выявлены только между интактным и активным контролями ($p < 0,05$). Во всех экспериментальных группах в лейкограмме отмечено различие с интактным контролем: число палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов было выше, моноцитов больше на 57–130 % и, соответственно,

¹ Исследование гематологических показателей выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории лекарственной токсикологии Алексеевой С.В.

количество лимфоцитов было в среднем в 2–3 раза ниже, чем в активном контроле. Следует отметить, что нейтрофилия и лимфопения отмечены во всех группах. Моноцитоз регистрировали в группах СНК-411, СНК-578 и их комбинаций с гемцитабином. Значимые различия с активным контролем наблюдались в группе комбинации СНК-411 с гемцитабином и группе гемцитабина, в которых содержание лимфоцитов и моноцитов было выше данных активного контроля, а число сегментоядерных нейтрофилов, соответственно ниже.

Таким образом, курсовое введение 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде основания (СНК-411) и соли (СНК-578) совместно с двукратным введением гемцитабина оказывало протекторное действие и препятствовало развитию анемии у мышей с аденокарциномой Са755 по сравнению с группой активного контроля. Необходимо также отметить, что при введении гемцитабина животные были вялыми и малоподвижными, совместное введение гемцитабина и производных 5-оксипиримидина значительно улучшало их состояние.

Через 7 дней после 14-ти дневного введения СНК-411 в дозе 25 мг/кг мышам с аденокарциномой Са755 ТРО составило 45% ($p=0,21$), при введении СНК-578 в дозе 10 мг/кг ТРО составляло 53% ($p=0,07$). Введение гемцитабина на 2 и 9 день опыта в суммарной дозе 150 мг/кг вызывало ТРО на 61% ($p=0,02$). При совместном введении СНК-411 с гемцитабином определено ТРО на 79% ($p=0,001$). При курсовом введении СНК-578 совместно с двукратным введением гемцитабина через 7 дней после окончания введения препаратов ТРО составило 80% ($p=0,001$) (таблица 8). Полученные в данной работе данные о совместном введении малотоксичных СНК-411 и СНК-578 с гемцитабином и ранее с доксорубицином указывают на дальнейшую возможность клинического исследования их применения с цитостатиками при солидных опухолях. Возможно, что, как и в проведенных экспериментальных работах, применение данных соединений позволит улучшить качество и продолжительность жизни онкобольных.

Таблица 7 – Влияние СНК-411 и СНК-578 и сочетанного применения с гемцитабином на показатели периферической крови мышей с аденокарциномой молочной железы Са755

Группа/ показатель	1 интактный контроль	2 активный контроль	3 СНК-411 25 мг/кг	4 СНК-411 25 мг/кг + гемцитабин 100 мг/кг	5 СНК-578 10 мг/кг	6 СНК-578 10 мг/кг + гемцитабин 100 мг/кг	7 гемцитабин 100 мг/кг	
Гемоглобин, г/л	120,0 (117,0:135)	66,0 ¹ (61,0:75,0)	79,0 ^{1,4,6} (63,0:88,0)	107,0 ^{2,3,5} (98,0:115,0)	69,0 ^{1,4,6} (63,0:77,0)	112,0 ^{2,3,5,7} (94,0:129,0)	89,0 ^{1,2,6} (78,0:103,0)	
Эритроциты, млн.	9,30 (8,84:9,38)	4,43 ¹ (4,27:5,43)	5,40 ^{1,4,6} (5,03:5,68)	7,90 ^{2,3,5} (7,22:8,97)	5,10 ^{1,4,6} (4,67:5,79)	8,24 ^{2,3,5,7} (7,24:8,97)	6,31 ^{1,2,6} (5,64:7,35)	
Гематокрит, %	39,0 (35,0:40,0)	21,0 ¹ (19,0:23,0)	22,0 ^{1,4,6} (21,0:24,0)	33,0 ^{2,3,5} (32,0:39,0)	22,0 ^{1,4,6} (20,0:24,0)	37,0 ^{2,3,5} (30,0:38,0)	28,0 ^{1,2,6} (25,0:33,0)	
Тромбоциты, тыс	712 (556:882)	490 (361:512)	444 ^{4,6,7} (320:525)	1050 ^{2,3,5} (857:1107)	507 ^{4,6,7} (314,0:538)	791 ^{2,3,5} (711:1097)	762 ^{2,3,5} (678:996)	
Лейкоциты, тыс	15,9 (13,8:26,0)	26,0 ¹ (24,0:29,9)	45,9 (15,3:118,3)	29,7 (13,8:32,1)	23,5 (19,6:68,6)	24,6 (22,1:26,7)	26,8 (25,5:36,0)	
Лейкограмма	П	0,0 (0,0:0,0)	3,0 ¹ (2,0:3,5)	4,0 ¹ (3,0:6,0)	1,5 ¹ (1,0:4,0)	3,0 ¹ (2,0:6,0)	3,0 ¹ (1,0:4,0)	2,0 ¹ (1,0:3,0)
	С	13,0 (9,0:14,0)	52,0 ¹ (45,0:58,0)	52,0 ^{1,4,6,7} (48,0:56,0)	21,0 ^{1,2,3,5,6} (18,0:29,0)	47,0 ^{1,4} (35,0:61,0)	39,0 ^{1,3,4} (38,0:50,0)	34,0 ^{1,2,3} (31,0:38,0)
	Э	1,0 (0,0:4,0)	1,5 (0,0:2,0)	0,5 (0,0:1,0)	0,5 (0,0:2,0)	0,0 (0,0:1,0)	2,0 (1,0:4,0)	2,0 (0,0:4,0)
	Б	0,0 (0,0:1,0)	0,0 (0,0:1,0)	0,0 (0,0:0,0)	0,0 (0,0:0,0)	0,0 (0,0:1,0)	0,0 (0,0:0,0)	0,0 (0,0:0,0)
	М	6,0 (5,0:6,0)	4,0 (3,0:4,5)	11,0 ¹ (8,0:20,0)	9,5 ^{1,2} (8,0:14,0)	14,0 ¹ (9,0:24,0)	10,0 ^{1,2} (6,0:14,0)	10,0 ^{1,2} (7,0:10,0)
	Л	81,0 (76,0:83,0)	35,5 ¹ (33,0:45,5)	30,0 ^{1,4,6,7} (21,0:38,0)	65,5 ^{1,2,3,5} (58,0:71,0)	33,0 ^{1,4,7} (22,0:43,0)	43,0 ^{1,3} (37,0:51,0)	51,0 ^{1,2,3,5} (45,0:56,0)

Примечания: 1-7 – $p < 0,05$ по критерию Данна;

П – палочкоядерные; С – сегментоядерные; Э – эозинофилы; Б – базофилы;

М – моноциты; Л – лимфоциты.

По результатам анализа данных, полученных в эксперименте, можно предположить, что продолжительность жизни самок мышей линии С57В1/6 с опухолью аденокарциномы Са755 была увеличена за счет более выраженного противоопухолевого эффекта комбинаций гемцитабина с СНК-411 и СНК-578 и нормализации гематологических показателей.

Таким образом, сочетанное применение гемцитабина с 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидином в форме основания (СНК-411) и соли (СНК-578) оказывало противоопухолевый эффект, соответствующий критериям эффективности [24].

Таблица 8 – Влияние СНК-411 и СНК-578 и их комбинаций с гемцитабином на рост аденокарциномы молочной железы Ca755

Группы, n=10	Средний объем опухоли, мм			ТРО на 21 сутки, %
	9-е сутки	16-е сутки	21-е сутки	
Активный контроль	3958,7±461,9	12766,6±1376,1	18837,4±4220,8	-
СНК-411 25 мг/кг	2289,4±227,5	12694±972,1	10320,8±1322,9	45%
СНК-411 25 мг/кг + гемцитабин 150 мг/кг	142,7 ±51,4*	777,1±209,9*	3913,2±1050,4*	79%
СНК-578 10 мг/кг	1603,4±172,3	7803,4±604,3	8827,4±2068,9	53%
СНК-578 10 мг/кг + гемцитабин 150 мг/кг	300 ±124,8*	1429,1±346,6*	3694,2±1094,1*	80%
гемцитабин 150 мг	403±105,6*	2030±408,9*	7398,1±1752,6*	61%

Примечания: n – количество животных в группе;

* - p < 0,05 по сравнению с контрольной группой, критерий Тьюки.

Медиана выживаемости у животных активного контроля составила 17,5 дней, при введении основания (СНК-411) в дозе 25 мг/кг -19 дней, а при введении соли (СНК-578) в дозе 10 мг/кг в/б –20 дней. При введении гемцитабина медиана выживаемости составила 25,5 дней, при введении гемцитабина в дозе 150 мг/кг с СНК-411 в дозе 25 мг/кг – 27 дней, при введении гемцитабина в дозе 150 мг/кг и СНК-578 - в дозе 10 мг/кг – 32 дня (рисунок 10).

Таблица 9 – Влияние СНК-411 и СНК-578 и их комбинаций с гемцитабином на продолжительность жизни мышей с аденокарциномой молочной железы Ca755

Группы, n=10	Средняя продолжительность жизни, суток	Увеличение продолжительности жизни, УПЖ %
Активный контроль	17	
СНК-411 25 мг/кг	20*	18%
СНК-411 25 мг/кг + гемцитабин 150 мг/кг	27,5*	62%
СНК-578 10 мг/кг	20,5*	21%
СНК-578 10 мг/кг + гемцитабин 150 мг/кг	29*	7%
Гемцитабин 150 мг/кг	24,5*	44 %

Примечания: n – количество животных в группе;

* - p < 0,05 по сравнению с контрольной группой с опухолью, F-тест Кокса.

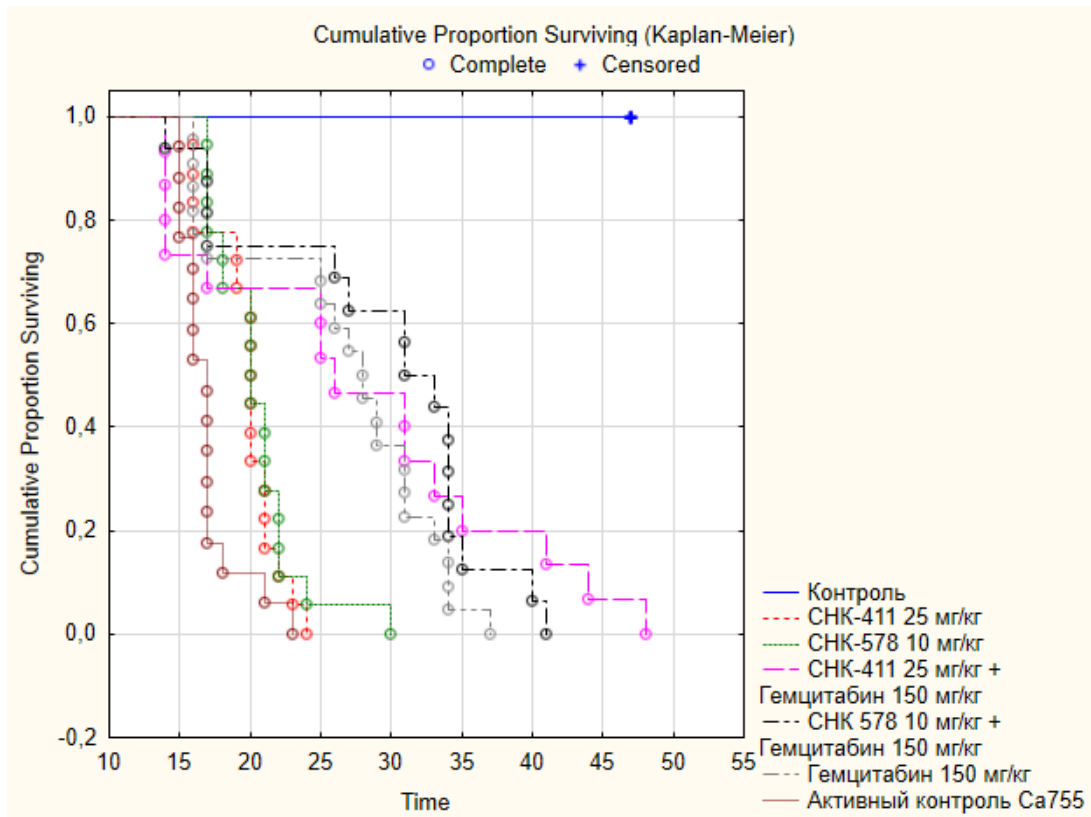


Рисунок 10 – Влияние СНК-411, СНК-578 и сочетанного применения с гемцитабином на продолжительность жизни мышей с аденокарциномой молочной железы Ca755

УПЖ при введении гемцитабина составило 44% ($p=0,001$), введение СНК-411 вызывало УПЖ на 18% ($p=0,009$), при введении СНК-578 УПЖ составило 21% ($p=0,002$). При совместном курсовом введении СНК-411 с двукратным введением гемцитабина наблюдалось УПЖ на 62% ($p=0,003$), при введении СНК-578 и гемцитабина УПЖ составило 71% ($p=0,0001$) (таблица 9). СПЖ животных при сочетанном применении гемцитабина и СНК-578 достоверно была больше СПЖ животных при монотерапии гемцитабином ($p=0,04$). Таким образом, УПЖ при сочетанном применении гемцитабина с СНК-411 и СНК-578 также соответствует критерию эффективности по выживаемости [24].

Согласно полученным данным курсовое введение СНК-411 и СНК-578 совместно с двукратным введением гемцитабина препятствовало угнетению кроветворения и развитию анемии у мышей с аденокарциномой Ca755, что является одним из механизмов поликомпонентного действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина, в разной степени характерного для производных пиримидина в целом. При сочетанном применении СНК-411 с гемцитабином содержание гемоглобина повысилось на 62%, а количество эритроцитов на 78% по

сравнению с группой активного контроля. В группе сочетанного применения СНК-578 с гемцитабином содержание гемоглобина было повышено на 69%, а количество эритроцитов на 86% по сравнению с активным контролем.

По результатам анализа данных, полученных в эксперименте, можно предположить, что продолжительность жизни животных-опухоленосителей была увеличена за счет противоопухолевого эффекта сочетанного применения гемцитабина с СНК-411 и СНК-578 и нормализации гематологических показателей.

Малорастворимое основание СНК-411 при введении в/б в дозе 25 мг/кг (в дозе эквивалентной 30 мг/кг соли СНК-578) и водорастворимая соль при введении в/б СНК-578 в дозе 10 мг/кг, вызывали равнозначное ТРО на модели аденокарциномы молочной железы Ca755, а также увеличивали продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

Полученные результаты опубликованы

- в статье с соавторами:

Журиков, Р.В. Влияние производных 5-оксипиримидина на противоопухолевый эффект гемцитабина, гематологические показатели и продолжительность жизни у мышей с аденокарциномой Ca755 // **Р.В. Журиков, Л.П. Коваленко, С.В. Алексеева [и др.]** // Вопросы Онкологии. – 2023. – № 2 (69). – С. 238-245;

- в тезисах с соавторами:

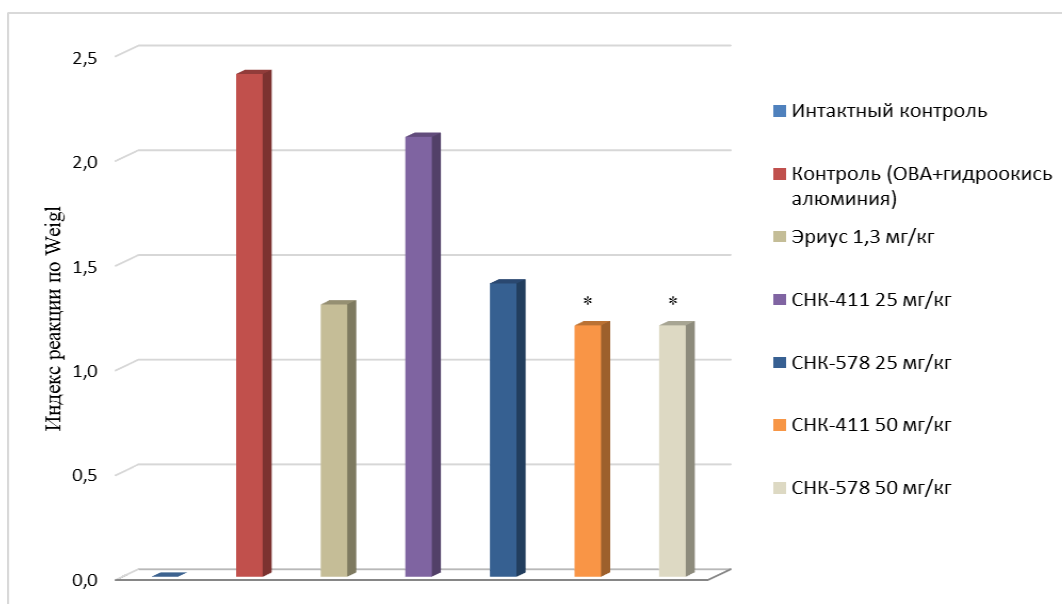
Журиков, Р.В. Доклиническое изучение гематопротекторных свойств производных 5-оксипиримидина на модели аденокарциномы молочной железы Ca755 / **Р.В.Журиков, С.В.Алексеева, Л.П.Коваленко [и др.]** // Материалы XII Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований лекарственных средств и клинических испытаний медицинских изделий» Санкт-Петербург. – 2025. – С.51.

3.2 Исследование противовоспалительной, противоаллергической и антимуtagenной активности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина

3.2.1 Исследование противоаллергической активности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в форме основания (СНК-411) и соли (СНК-578) на модели системной реакции анафилаксии

Изучено подавление реакции системной анафилаксии к овальбумину под действием СНК-411, СНК-578 и препарата Эриус на 140 мышах линии BALB/c. После второй иммунизации овальбумином СНК-411, СНК-578 вводили в течение 7 дней в/б в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг, препарат Эриус вводили в/б в дозе 1,3 мг/кг, затем через 1 час после последнего введения соединений в ретроорбитальный синус вводили внутривенно овальбумин (по 100 мкг в 0,1 мл физиологического раствора).

У иммунизированных овальбумином мышей развивалась анафилактическая реакция различной степени тяжести. У животных группы интактного контроля реакция анафилаксии не развивалась. 60% мышей в группе активного контроля погибли в течение 15-20 минут, у 20% развилась анафилаксия средней степени угнетенного состояния у 20% мышей слабой степени. При введении основания СНК-411 в дозе 25 мг/кг в результате реакции анафилаксии погибло 50% мышей, у 10% развивалась анафилаксия средней степени тяжести, у 40% развивалась анафилаксия легкой степени тяжести, при введении СНК-411 в дозе 50 мг/кг погибли 30% мышей, у 30% мышей развилась анафилаксия легкой степени тяжести, у 40% мышей реакция отсутствовала. При введении соли СНК-578 в дозе 25 мг/кг от тяжелой степени реакции системной анафилаксии 40% мышей погибли, у 30% животных развилась реакция средней тяжести, у 30% мышей реакция отсутствовала. При введении СНК-578 в дозе 50 мг/кг погибло 30% мышей, у 10% наблюдали слабую реакцию анафилаксии, у 10% - среднюю, у 50% мышей реакция анафилаксии отсутствовала. При введении препарата Эриус погибло 40% мышей, у 10% мышей наблюдали реакцию анафилаксии легкой степени, у 50% мышей реакции не было (рисунок 11).



Примечание:

* – $p < 0,05$ по сравнению с активным контролем, критерий Манна-Уитни.

Рисунок 11 – Влияние СНК-411 и СНК-578 на выраженность аллергической реакции на модели системной анафилаксии на овальбумин у мышей линии BALB/c

2-Изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин как в форме основания (СНК-411), так и в форме соли (СНК-578) одинаково снижает индекс анафилактической реакции в дозе 50 мг/кг.

3.2.2 Мультиплексное исследование концентрации цитокинов и IgE в сыворотке крови мышей на модели системной реакции анафилаксии

Измерение содержания цитокинов и IgE в сыворотке крови мышей проводили на проточном цитометре BD FACSCanto II по методу мультиплексного определения флуоресцентных частиц.

Введение основания СНК-411 и соли СНК-578 в дозе 50 мг/кг в/б вызывало значимое снижение содержания IgE в сыворотке крови сенсibilизированных мышей в 1,5-1,6 раз, соответственно (таблица 10). Введение препарата Эриус дозе 1,3 мг/кг в/б не вызывало статистически достоверного снижения концентрации IgE в сыворотке крови иммунизированных овальбумином мышей по сравнению с активным контролем (таблица 10).

Концентрации ИЛ-10 и ИЛ-17F в сыворотке крови мышей контрольных и опытных групп были ниже определяемого минимального порогового значения.

Таблица 10 – Влияние 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на концентрацию иммуноглобулина Е (IgE) в сыворотке крови мышей, иммунизированных овалбумином

Группы животных, n=10	Концентрация IgE (нг/мл) Me (Q1-Q4)
Контроль	45,4 (27,56:72,58)
Активный Контроль (Альбумин+гидроокись алюминия)	76,5 (65,5:100,0)*
Эриус 1,3 мг/кг	56,0 (47,7:72,5)*
СНК-411 25 мг/кг	68,8 (55,2:90,0)*
СНК-411 50 мг/кг	50,2 (30,6:64,3)**
СНК-578 25 мг/кг	61,0 (53,2:81,1)*
СНК-578 50 мг/кг	49,1 (44,4:51,1)**

Примечания: n – количество животных в группе, * – $p < 0,05$ по критерию Данна по сравнению с контрольной группой; ** – $p < 0,05$ по критерию Данна по сравнению с активным контролем.

Таблица 11 – Влияние 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышей, иммунизированных овалбумином

Группы животных, n=10	Концентрация цитокинов (пг/мл)							
	ИФН- γ	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-13	ИЛ-5	ИЛ-6	ИЛ-11	ИЛ-17-A
Контроль	245,77 \pm 25,19	124,64 \pm 17,42	14,28 \pm 4,43	20,47 \pm 2,56	34,46 \pm 5,24	20,87 \pm 5,82	107,55 \pm 20,08	28,64 \pm 7,51
Активный контроль	32,45 \pm 8,04*	68,24 \pm 3,39*	33,02 \pm 2,57	39,27 \pm 4,34	57,10 \pm 7,44	59,06 \pm 21,9*	95,20 \pm 10,39	22,49 \pm 2,05
Эриус 1,3 мг/кг	57,23 \pm 8,40*	60,44 \pm 9,30*	9,0 \pm 0,63**	8,06 \pm 2,98**	18,55 \pm 0,40**	40,28 \pm 7,90	60,37 \pm 18,7	15,08 \pm 4,37
СНК-411 25 мг/кг	49,05 \pm 9,98*	100,24 \pm 14,18	9,14 \pm 0,64**	1,65 \pm 0,29**	16,54 \pm 3,38**	27,34 \pm 2,67	40,91 \pm 8,14**	9,63 \pm 1,56*
СНК-411 50 мг/кг	164,36 \pm 16,79*	100,05 \pm 10,07	10,05 \pm 0,62**	5,34 \pm 2,24**	21,87 \pm 5,09**	95,21 \pm 8,48	34,28 \pm 5,45**	10,18 \pm 2,70*
СНК-578 25 мг/кг	98,25 \pm 37,55*	105,49 \pm 14,8	12,47 \pm 2,47**	5,68 \pm 2,27**	18,46 \pm 4,96**	30,04 \pm 3,16	48,90 \pm 11,4**	17,61 \pm 3,38
СНК-578 50 мг/кг	305,26 \pm 59,38	102,40 \pm 17,66	10,32 \pm 0,95**	5,38 \pm 2,42**	26,14 \pm 3,77**	2,75 \pm 0,22**	30,58 \pm 5,56**	15,89 \pm 2,23

Примечания: n – количество животных в группе; * – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с контролем;

** – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с активным контролем.

Согласно данным, представленным в таблице 11, иммунизация мышей овалбумином в смеси с гидроокисью алюминия приводила к уменьшению концентрации Th1 цитокинов в сыворотке крови, а именно ИФН- γ , ИЛ-2, и увеличению концентрации Th2 цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, а также ИЛ-6. СНК-411, СНК-578 и препарат Эриус значительно снижали концентрацию Th2

цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 по сравнению с активным контролем. СНК-411 и СНК-578 значительно увеличивали содержание ИЛ-2, СНК-578 в дозе 50 мг/кг также увеличивало содержание ИФН- γ до уровня интактного контроля и значительно снижало содержание ИЛ-6. СНК-411 и СНК-578 снижали содержание ИЛ-11 по сравнению с активным контролем, СНК-411 снижал содержание ИЛ-17А (таблица 11). Малорастворимое основание СНК-411 при введении в/б (в дозах эквивалентных 60 мг/кг соли СНК-578) и водорастворимая соль СНК-578 при введении в/б в дозе 50 мг/кг, одинаково снижали выраженность реакции анафилаксии и снижали концентрации проалергенных интерлейкинов.

Полученные результаты опубликованы

- в статье с соавторами:

Коваленко, Л.П. Влияние производных 5-оксипиримидина и препарата сравнения Эриус на выраженность системной реакции анафилаксии, уровень иммуноглобулина Е (IgE) и цитокинов у мышей линии BALB/c / Л.П. Коваленко, **Р.В. Журиков**, Е.А. Вальдман [и др.] // Медицинская иммунология. – 2024. – № 6 (26). – С. 1197-1204;

- в тезисах с соавторами:

Журиков, Р.В. Влияние производных 5-оксипиримидина и препарата сравнения Эриус на выраженность системной реакции анафилаксии и уровень иммуноглобулина Е у самцов мышей линии BALB/c / **Р.В. Журиков**, Л.П. Коваленко, С.В. Никитин // Экспериментальная и клиническая фармакология, Материалы VI съезда фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи – новые лекарства» – 2023.– Т.86, № 11S.– С.56.

3.2.3 Изучение противовоспалительной активности

2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в форме основания (СНК-411) и соли (СНК-578) на модели индуцированного полным адьювантом Фрейнда отека стопы и скакательного сустава у крыс

Изучено влияние СНК-411, СНК-578 и преднизолона на отек, вызванный ПАФ, на аутбредных самцах крыс. Изучаемые соединения вводили в/б за 24 часа и за два часа до введения ПАФ: СНК-411 в дозах 25 мг/кг и 40 мг/кг, СНК-578 в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг. Отек измеряли через 24 часа после введения ПАФ.

По результатам, представленным в таблице 12, двукратное введение преднизолона в/б в дозе 10 мг/кг вызывало значимое подавление отека плюсневой области стопы и скакательного сустава у крыс, иммунизированных ПАФ. Введение в/б водорастворимой соли СНК-578 в дозе 10 мг/кг и малорастворимого основания СНК-411 в дозе 25 мг/кг не подавляло экссудативный отек стопы и скакательного сустава, вызванный ПАФ.

Таким образом, СНК-411 при введении в/б в дозе эквивалентной 48 мг/кг соли СНК-578 значимо снижало отек стопы и скакательного сустава и обладает сопоставимым с преднизолоном, введенным в/б в дозе 10 мг/кг, противовоспалительным эффектом. Соль СНК-578, изученная в меньших дозах, противовоспалительного эффекта не продемонстрировала.

Таблица 12 – Изменение диаметра стопы в плюсневой области и скакательного сустава правой задней конечности крыс с вызванным ПАФ воспалительным процессом

Группы, n=10	Активный контроль ПАФ	Преднизолон 10 мг/кг	СНК-578 10 мг/кг	СНК-578 25 мг/кг	СНК-411 25 мг/кг	СНК-411 40 мг/кг
Диаметр стопы, см	2,25 (2,17:2,68)	1,92 (1,77:1,98)*	2,16 (1,98:2,35)	1,96 (1,67:2,16)	2,34 (2,13:2,45)	1,77 (1,4:2,05)*
Диаметр сустава, см	1,82 (1,6:2,02)	1,27 (0,9:1,81)*	1,52 (0,73:1,95)	1,6 (1,38:1,89)	1,61 (1,15:1,76)	1,17 (0,65:1,32)*

Примечания: n – количество животных в группе; * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой по критерию Манна-Уитни.

Воспаление является многокомпонентным процессом, с множеством альтернативных и перекрещивающихся связей. При аллергических реакциях немедленного типа, в частности аллергической бронхиальной астме, метаболизм арахидоновой кислоты в основном идет по липооксигеназному пути. При индукции отека лапы крыс в ответ на введение ПАФ основную роль играют продукты липооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты [25]. Полученные в данной работе результаты согласуются также с ранее полученными данными о противоаллергическом действии 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на модели системной реакции анафилаксии на овальбумин в опытах на морских свинках альбиносах, в которой СНК-411 при в/б введении в дозе 50 мг/кг в 1,8 раза подавлял индекс анафилактической реакции по Weigle на овальбумин. СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг также обладал противоаллергическим действием, в 2,8 и в 10 раз подавляя индекс анафилактической реакции по Weigle [8].

Таким образом, полученные данные указывают на возможное ингибирование 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидином липооксигеназного пути воспаления, что целесообразно изучить в дальнейших исследованиях.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Журиков, Р.В. Противовоспалительное действие производных 5-оксипиримидина на модели индуцированного полным адьювантом Фрейнда отека стопы и скакательного сустава у крыс. // **Р.В. Журиков**, Л.П. Коваленко, С.В. Никитин // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2022. – № 3. – С. 33-36.

3.2.4 Оценка противовоспалительной активности, анальгетических свойств основания СНК-411 и соли СНК-578, и их влияния на двигательную активность и гематологические показатели крыс Wistar на модели индуцированного полным адьювантом Фрейнда артрита

В ранее проведенных исследованиях на модели рака шейки матки РШМ-5, производные 5оксипиримидина на 87% снижали массу опухоли и выражено подавляли концентрации ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-17А в сыворотках крови мышей-опухоленосителей по сравнению с активным и интактным контролем. ИЛ-10 и ИЛ-17А ассоциированы с различными аутоиммунными и хроническими воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, псориаз и проонкогенным действием различного генеза (9).

Изучение действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в форме основания (СНК-411) и соли (СНК-578) проводили на крысах линии Wistar с адьювантным артритом.² На 15 и 24 дни опыта у животных определяли болевую чувствительность в тесте «горячая пластина» на установке Plantar Test. Отек стопы и скакательного сустава регистрировали на 1, 11, 15, 20 и 24 дни опыта. На инфракрасном актиметре на 14 и 24 сутки определяли двигательную активность животных контрольных и опытных групп. На 25 сутки у крыс брали кровь. В конце эксперимента была измерена масса тела, тимуса и селезенки.

² Исследование гематологических показателей выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории лекарственной токсикологии Алексеевой С.В.

Согласно полученным данным, значимая противоболевая активность в подошвенном тесте на 15-ые сутки наблюдения была определена при введении диклофенака на обеих лапах, при введении в/б основания СНК-411 (в дозе эквивалентной 48 мг/кг СНК-578) и соли СНК-578 в дозе 25 мг/кг на правой лапе (таблица 13).

На 24-е сутки наблюдения только диклофенак обладал анальгетической активностью (таблица 14).

Таблица 13 – Влияние СНК-411, СНК-578 и диклофенака на выраженность термической гипералгезии в подошвенном тесте у крыс с отеком стопы, вызванным ПАФ или артритом на 15 день опыта

Группы, n=10	Латентный период отдергивания, сек	
	Левая лапа (адьювант)	Правая лапа (артрит)
Контроль	10,93±0,43*	11,02±0,54*
Активный контроль	8,37±0,28	7,67±0,34
Диклофенак 5 мг/кг	12,32±1,01*	12,9±0,68*
СНК-411 25 мг/кг	7,03±0,7	11,4±0,7*
СНК-411 40 мг/кг	9,18±0,43	9,08±0,29
СНК-578 10 мг/кг	8,48±0,9	8,48±0,6
СНК-578 25 мг/кг	8,35±0,67	10,28±0,44*

Примечания: n – число животных в группе; * – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с активным контролем.

Таблица 14 – Влияние СНК-411, СНК-578 и диклофенака на выраженность термической гипералгезии в подошвенном тесте у крыс с отеком стопы, вызванным ПАФ на 24 день опыта

Группы, n=10	Латентный период отдергивания, сек	
	Левая лапа (адьювант)	Правая лапа (артрит)
Контроль	10,65±0,42*	10,6±0,32*
Активный контроль	7,26±0,63	8,4±0,42
Диклофенак	12,14±0,43*	12,9±0,68*
СНК-411 25 мг/кг	7,6±0,83	7,9±0,3
СНК-411 40 мг/кг	7,56±0,77	8,2±0,8
СНК-578 10 мг/кг	7,6±0,58	9±0,37
СНК-578 25 мг/кг	8,6±0,6	9,62±0,6

Примечания: n – число животных в группе; * – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с активным контролем.

При измерении отека левого скакательного сустава было определено, что диклофенак в дозе 5 мг/кг значительно снижает отечность левого скакательного сустава на 11, 20 и 23 сутки наблюдения. Введение основания СНК-411 в дозе эквивалентной 48 мг/кг соли СНК-578 также проявляет противовоспалительную активность в данной модели также на 11 сутки наблюдения (таблица 15).

Таблица 15 – Влияние СНК-411, СНК-578 и диклофенака на отек левого скакательного сустава, вызванного введением в левую стопу ПАФ

Группы, n=10	Размер левого сустава (адьювант), мм			
	11 сутки – 2-й день введения препаратов	15 сутки	20 сутки	24 сутки
Контроль	3,07±0,1*	3,04±0,07*	3,03±0,05*	2,93±0,1*
Активный контроль	3,7±0,11	3,85±0,08	4,09±0,25	3,93±0,24
Диклофенак 5 мг/кг	3,57±0,11*	3,82±0,38	3,43±0,12*	3,86±0,38
СНК-411 25 мг/кг	3,7±0,24	3,94±0,19	4,09±0,13	3,85±0,23
СНК-411 40 мг/кг	3,05±0,18*	3,81±0,16	3,7±0,33	3,61±0,34
СНК-578 10 мг/кг	3,9±0,14	3,86±0,09	4,3±0,27	4,03±0,24
СНК-578 25 мг/кг	3,8±0,15	3,91±0,1	4,28±0,29	4,21±0,31

Примечания: n – число животных в группе;

* – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с активным контролем.

Таким образом, основание СНК-411 в дозе 40 мг/кг, значительно снижает отечность левого скакательного сустава и проявляет противовоспалительную активность на ПАФ-индуцированный отек только на 11 сутки наблюдения.

Ни одно из изученных соединений не уменьшает значительно отек левой стопы, вызванный введением ПАФ, на 20-е сутки опыта по сравнению с активным контролем, противовоспалительная активность диклофенака не определена (таблица 16).

Таблица 16 – Влияние СНК-411, СНК-578 и диклофенака на отек левой стопы, вызванного введением в левую стопу ПАФ

Группы, n=10	Размер левой стопы (адьювант), мм			
	11 сутки – 2-й день введения препаратов	15 сутки	20 сутки	24 сутки
Контроль	2,11±0,05*	2,23±0,06*	2,26±0,08*	2,29±0,05*
Активный контроль	3,79±0,09	3,93±0,15	4,32±0,25	4,00±0,22
Диклофенак 5 мг/кг	3,68±0,16	3,47±0,35	3,84±0,27	3,86±0,38
СНК-411 25 мг/кг	3,57±0,24	3,48±0,23	3,27±0,36	3,47±0,20
СНК-411 40 мг/кг	3,74±0,2	4,48±0,34	4,35±0,23	4,45±0,62
СНК-578 10 мг/кг	4,17±0,19	4,19±0,17	4,01±0,25	3,79±0,20
СНК-578 25 мг/кг	3,8±0,18	4,21±0,22	4,06±0,28	3,8±0,24

Примечания: n – число животных в группе;

* – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с активным контролем.

Диклофенак достоверно уменьшает отек правого скакательного сустава, вызванного развитием адьювантного артрита, в течение всего опыта, а СНК-411 и СНК-578 во всех изученных дозах значительно уменьшают отек скакательного сустава только на 11 сутки наблюдения (таблица 17).

Таблица 17 – Влияние СНК-411, СНК-578 и диклофенака на отек правого скакательного сустава, вызванного введением в левую стопу ПАФ

Группы, n=10	Размер правого сустава (артрит), мм			
	11 сутки – 2-й день введения препаратов	15 сутки	20 сутки	24 сутки
Контроль	3,08±0,1	2,90±0,08*	2,90±0,08*	2,83±0,1*
Активный контроль	3,60±0,04	3,54±0,06	3,70±0,05	3,87±0,04
Диклофенак 5 мг/кг	2,95±0,08*	2,82±0,1*	2,90±0,1*	2,86±0,10*
СНК-411 25 мг/кг	2,95±0,07*	3,35±0,08	3,34±0,10	3,54±0,10
СНК-411 40 мг/кг	2,60±0,11*	3,37±0,11	3,40±0,10	3,55±0,20
СНК-578 10 мг/кг	3,09±0,06*	3,46±0,12	3,50±0,10	3,61±0,20
СНК-578 25 мг/кг	2,80±0,08*	3,29±0,08	3,39±0,08	3,56±0,10

Примечания: n – число животных в группе;

* – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с активным контролем.

Диклофенак проявляет противовоспалительную активность в отношении отека правой стопы во все дни наблюдения, а СНК-411 и СНК-578 во всех изученных дозах – только на 11 сутки наблюдения (таблица 18).

Таблица 18 – Влияние СНК-411, СНК-578 и диклофенака на отек правой стопы, вызванного введением в левую стопу ПАФ

Группы, n=10	Размер правой стопы (артрит), мм			
	11 сутки – 2-й день введения препаратов	15 сутки	20 сутки	24 сутки
Контроль	2,11±0,05*	2,04±0,04*	2,33±0,07*	2,38±0,1*
Активный контроль	2,44±0,04	3,41±0,1	3,49±0,1	3,48±0,1
Диклофенак	2,01±0,05*	2,1±0,08*	2,31±0,07*	2,52±0,3*
СНК-411 25 мг/кг	2,08±0,01*	3,38±0,06	3,43±0,05	3,3±0,1
СНК-411 40 мг/кг	1,92±0,1*	3,31±0,1	3,40±0,07	3,44±0,1
СНК-578 10 мг/кг	2,12±0,06*	3,32±0,08	3,37±0,08	3,34±0,06
СНК-578 25 мг/кг	2,06±0,05*	3,46±0,09	3,50±0,08	3,52±0,1

Примечания: n – число животных в группе;

* – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с активным контролем.

На 14 сутки наблюдения значительно уменьшалось пройденное расстояние и количество подъемов в стойку у животных активного контроля, по сравнению с интактным контролем. На 14-е сутки наблюдения курсовое введение диклофенака в дозе 5 мг/кг и основания СНК-411 в дозе 40 мг/кг увеличило пройденное расстояние и количество подъемов в стойку до уровня интактного контроля (таблица 19).

На 22-е сутки наблюдения у активного контроля также значительно уменьшались как пройденное расстояние, так и количество подъемов в стойку по сравнению с интактным контролем (таблица 20). Введение основания СНК-411 в дозе 40 мг/кг и диклофенака в дозе 5 мг/кг увеличило пройденное расстояние по сравнению с активным контролем.

Таблица 19 – Влияние СНК-411, СНК-578 и диклофенака на двигательную активность у крыс линии Wistar с адьювантным артритом на 14 день опыта

Группы, n=10	Расстояние, см	Количество подъемов в стойку
Контроль	834,8±83,1*	10,9±4,12*
Активный контроль	367,1±34,6	3,25±1,4
Диклофенак 5 мг/кг	811,6±61,5*	8,6±2*
СНК-411 25 мг/кг	444±100,5	4,5±1,3
СНК-411 40 мг/кг	601,6±175,5*	8,1±4,3*
СНК-578 10 мг/кг	319,8±54,5	2,8±0,7
СНК-578 25 мг/кг	501,7±89	4,2±1,7

Примечания: n – число животных в группе;

* – $p < 0,05$ по тесту Даннета по сравнению с активным контролем.

Таблица 20 – Влияние СНК-411, СНК-578 и диклофенака на двигательную активность у крыс линии Wistar с адьювантным артритом на 22 день опыта

Группы, n=10	Расстояние, см	Количество подъемов в стойку
Контроль	724,4±20,4*	5,1±1,8*
Активный контроль	56,2±4,7	1,5±0,5
Диклофенак 5 мг/кг	643,3±95,8*	8,4±2*
СНК-411 25 мг/кг	287,4±57,4	4,4±2,1
СНК-411 40 мг/кг	521,6±86,8*	2,5±1,1

Продолжение таблицы 20

СНК-578 10 мг/кг	311,7±72,7	2,27±0,9
СНК-578 25 мг/кг	273±65,8	2,9±1,5

Примечания: n – количество животных в группе;

* – $p < 0,05$ по тесту Даннета по сравнению с активным контролем.

Согласно данным в таблице 21 у животных, которым вводили диклофенак, определено достоверное уменьшение прироста массы тела по сравнению с интактным контролем, в течение опыта при введении диклофенака у них наблюдались диспептические расстройства. В конце эксперимента не наблюдали значимых изменений массы тимуса и селезенки животных контрольных и опытных групп.

Таблица 21 – Прирост массы тела, масса тимуса и селезенки у животных контрольных и опытных групп

Группы, n=10	Прирост массы тела, г	Масса тимуса, мг	Масса селезенки, мг
Контроль	96,8±7,01	414,6±27,12	2309,0±226,7
Активный контроль	72,2±9,8	425,9±25,5	2063,5±166,5
Диклофенак 5 мг/кг	28,3±18,4*	306,7±45,9	2293,0±507,5
СНК-411 25 мг/кг	91,7±11,1	498,7±70,0	2423,3±274,2
СНК-411 40 мг/кг	57,2±12,0	406,2±34,6	1646,8±177,5
СНК-578 10 мг/кг	75,3±10,2	399,2±17,4	1805,4±150,4
СНК-578 25 мг/кг	73,3±5,0	400,8±37,2	1776,2±93,6

Примечания: n – число животных в группе;

* – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с интактным контролем.

Согласно таблице 22 в группах, которым вводили СНК-411 и СНК-578, отмечено повышение содержания гемоглобина, по сравнению с группами диклофенака, интактного и активного контроля.

Введение диклофенака приводило к значимому снижению содержания эритроцитов и гемоглобина, а также гематокрита по сравнению с интактным контролем. Содержание тромбоцитов увеличилось в 2 раза, лейкоцитов в 3 и 2 раза по сравнению с показателями группы интактного и активного контроля соответственно.

Таблица 22 – Влияние 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина и диклофенака на показатели периферической крови крыс линии Wistar с адьювантным артритом

Группа Параметр	1 контроль	2 активный контроль	3 диклофенак	4 СНК-411 25 мг/кг	5 СНК-411 40 мг/кг	6 СНК-578 10 мг/кг	7 СНК-578 25 мг/кг
Гемоглобин, г/л	122,5 117,0 ÷ 147,0	142,0 137,0 ÷ 147,0	105,0 ¹⁻⁶ 103,0 ÷ 115,0	147,0 ^{1,3} 138,0 ÷ 153,0	160,0 ^{1,2,3} 147,0 ÷ 164,0	152,0 ^{1,2,3} 147,0 ÷ 166,0	156,0 ^{1,2,3} 148,0 ÷ 162,0
Эритроциты, млн	8,93 7,20 ÷ 9,38	7,84 7,68 ÷ 8,43	6,07 ¹⁻⁶ 4,50 ÷ 6,59	7,76 ³ 7,45 ÷ 8,18	8,12 ³ 7,46 ÷ 8,47	8,10 ³ 7,27 ÷ 8,70	8,29 ³ 7,96 ÷ 8,67
Гематокрит, %	38,85 34,60 ÷ 47,27	43,10 39,60 ÷ 43,74	30,50 ¹⁻⁶ 29,0 ÷ 31,60	41,20 38,40 ÷ 44,70	43,50 40,20 ÷ 45,0	43,10 41,40 ÷ 45,60	44,40 ÷ 41,70 ÷ 46,10
Средний объем эритроцитов, фл	47,0 42,0 ÷ 52,0	53,0 51,0 ÷ 56,0	50,0 48,0 ÷ 65,0	52,0 49,0 ÷ 53,60	54,0 51,0 ÷ 55,0	54,0 51,0 ÷ 56,0	53,0 51,0 ÷ 55,0
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	14,25 13,20 ÷ 16,40	17,80 16,40 ÷ 19,50	17,50 17,20 ÷ 22,90	18,60 ¹ 17,90 ÷ 18,70	19,70 ^{1,2} 19,44 ÷ 19,70	19,10 ^{1,2} 18,50 ÷ 20,70	18,80 ^{1,2} 18,20 ÷ 19,20
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитарной массе, пг	312,5 298,0 ÷ 355,0	346,0 314,0 ÷ 350,0	355,0 344,0 ÷ 365,0	356,0 341,0 ÷ 363,0	366,0 ^{1,2} 357,0 ÷ 366,0	357,0 ¹ 349,0 ÷ 364,0	353,0 ¹ 348,0 ÷ 356,0
Тромбоциты, тыс	453,0 428,0 ÷ 712,0	609,0 467,0 ÷ 722,0	909,0 ¹⁻⁶ 894,0 ÷ 1147	596,0 ³ 566,0 ÷ 641,0	667,0 ³ 577,0 ÷ 720,0	639,0 ³ 481,0 ÷ 679,0	700,0 ³ 598,0 ÷ 813,0
Тромбокрит, %	0,24 0,22 ÷ 0,30	0,31 0,25 ÷ 0,38	0,47 ¹⁻⁶ 0,41 ÷ 0,66	0,31 0,30 ÷ 0,32	0,34 0,30 ÷ 0,37	0,34 0,25 ÷ 0,36	0,36 0,30 ÷ 0,42
Лейкоциты, тыс	16,0 13,30 ÷ 18,20	22,50 20,40 ÷ 24,50	50,30 ¹⁻⁶ 27,80 ÷ 61,20	26,30 18,0 ÷ 33,20	26,20 22,31 ÷ 27,30	22,70 18,30 ÷ 27,80	24,10 20,0 ÷ 31,20

Примечание: 1-6 - $p < 0,05$ между группами по критерию Данна.

Обобщая полученные экспериментальные данные у крыс с адьювантным артритом можно отметить, что курсовое введение 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в форме основания (СНК-411) и соли (СНК-578) дозе 25 мг/кг вызывает анальгетический эффект только в правой лапе с артритом на 15-й день опыта, а диклофенак в дозе 5 мг/кг проявляет анальгетическую активность на 15 и 24 дни опыта на обеих лапах. При измерении отека левого скакательного сустава было определено, что диклофенак в дозе 5 мг/кг и основание СНК-411 в дозе 40 мг/кг (эквивалентной 48 мг/кг соли СНК-578) значительно снижает отечность сустава на 11 сутки наблюдения. На 14-е сутки наблюдения на инфракрасном актиметре курсовое введение диклофенака в дозе 5 мг/кг и основания СНК-411 в дозе 40 мг/кг увеличивает пройденное расстояние по сравнению с активным контролем. На 22-е сутки наблюдения диклофенак и СНК-411 в дозе 40 мг/кг увеличивали пройденное расстояние по сравнению с активным контролем. У животных, которым вводили диклофенак, в конце опыта определено достоверное уменьшение прироста массы тела по сравнению с интактным контролем, при курсовом введении СНК-411 и СНК-578 отмечено повышение содержания гемоглобина по сравнению с группой активного контроля и группой, которой вводили диклофенак. Полученные данные согласуются с данными о влиянии СНК-411 и СНК-578 на показатели крови мышей с аденокарциномой Са755.

Таким образом, курсовое ведение в/б основания СНК-411 в дозе 40 мг/кг (эквивалент 48 мг/кг СНК-578), значительно увеличивает пройденное расстояние крыс с адьювантным артритом. Во всех изученных дозировках обе формы 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина увеличивают содержание гемоглобина и эритроцитов, а также в диапазоне доз равных 25-48 мг/кг водорастворимой соли обладают умеренным анальгетическим действием.

Полученные результаты опубликованы в тезисах с соавторами:

Журиков, Р.В. Изучение эффектов производных 5-оксипиримидина на модели адьювантного артрита / **Р.В. Журиков, С.В. Алексеева, С.В. Никитин.** // Экспериментальная и клиническая фармакология, Материалы VI съезда фармакологов России «Смена поколений и сохранение традиций. Новые идеи – новые лекарства», 2023. — Т.86, №11s. — С.56-57.

3.2.5 Оценка генотоксичности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578)

Исследование выполнено на половозрелых самцах мышей-гибридов F1 СВАхС57В1/6, соль СНК-578 вводили в/б в дозах 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг. Модельный мутаген и изучаемое соединение вводили одновременно на срок 24 часа.

Согласно данным, представленным в таблице 23, установлено, что 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин форме соли (СНК-578) в диапазоне исследованных доз не оказывает статистически значимого влияния на цитогенетические эффекты циклофосамида и диоксицина.

Таблица 23 – Влияние СНК-578 на кластогенные эффекты циклофосамида и диоксицина

Группы	Количество клеток	На 100 исследованных клеток					Клеток с хромосомными повреждениями (M±m %)
		Гепы	Одиночные фрагменты	Парные фрагменты	Обмены	Клетки с множественными повреждениями	
Контроль	500	0,4	0,8	0	0	0	1,2±0,5
Циклофосфамид 20 мг/кг + СНК-578	500	0,8	17,8	0,2	2,4	6,2	18,4±1,7
	400	0,3	19,3	0,3	3,3	9,8	22,0±2,1
	500	0,6	17,0	0,2	3,6	7,2	21,4±1,8
	400	0,8	21,5	0,8	1,8	5,0	21,5±2,1
Диоксицин 200мг/кг +СНК-578	500	0,2	10,0	0	0,2	3,8	10,0±1,3
	500	0	4,2	0	0,4	6,2	9,4±1,3
	400	0	5,3	0	0,5	5,3	9,0±1,4
	500	0	4,8	0,2	0,6	3,4	7,0±1,1

Примечание: * – p<0,05 по угловому преобразованию Фишера.

Соль СНК-578 при введении в дозах 10 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг не оказывает влияния на эффекты генотоксикантов. Полученные данные косвенно свидетельствуют об отсутствии у соединения собственной мутагенной активности.

3.3 Исследование механизмов действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина

3.3.1 Определение способности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578) ингибировать активность ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2

Влияние соли СНК-578 на активность ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2 изучали в бесклеточной системе.³ Регистрацию показателей колориметрии производили на спектрофотометре Varioskan Lux.

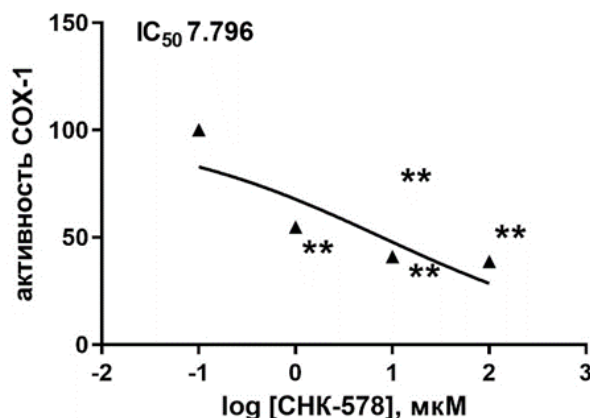
Валидацию активности фермента проводили с помощью ингибиторов ЦОГ-1 и ЦОГ-2, поставляемых в наборе. При концентрации, равной IC_{50} , данные вещества показали ~50% ингибирования ферментов:

SC-560 (кат.№ 760159- ингибитор ЦОГ-1, $IC_{50}=5nM$) - % ингибирования = $54,38 \pm 0,62$;

DuP-697 (кат.№ 760158-ингибитор ЦОГ-2, $IC_{50}=25nM$) - % ингибирования = $57,38 \pm 8,23$.

Группа контроля – 0 мкМ СНК-578 (соответствует 100% начальной активности).

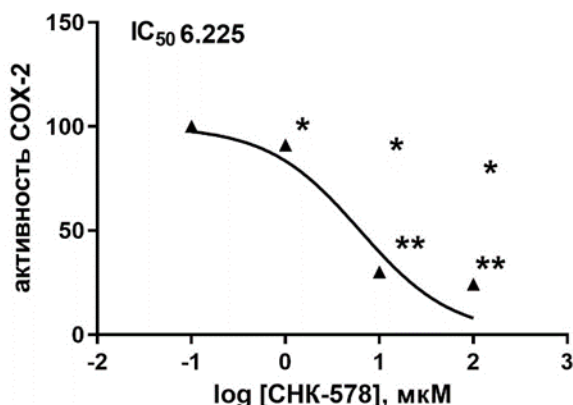
Соль СНК-578 изучали в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ и 100 мкМ. При всех концентрациях СНК-578 было определено значимое ингибирование активности ЦОГ-1. Определено значимое ингибирование активности ЦОГ-2 СНК-578 (рисунок 12, рисунок 13).



Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом по Даннетту. Каждая точка на графике представляет $Mean \pm SD$, $n=3$.

Рисунок 12 – Концентрационно-зависимое ингибирование активности ЦОГ-1 СНК-578

³ Исследование выполнено совместно с заведующей лабораторией молекулярной фармакологии, кандидатом биологических наук Зайнуллиной Л.Ф.



Примечание: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом по Даннетту. Каждая точка на графике представляет $\text{Mean} \pm \text{SD}$, $n=3$.

Рисунок 13 – Концентрационно-зависимое ингибирование активности ЦОГ-2 СНК-578

В программном обеспечении GraphPad Prism 9.0 методом нелинейной регрессии был вычислен показатель IC_{50} (концентрация вещества, вызывающая ингибирование активности фермента на 50%), после чего был рассчитан индекс селективности СНК-578.

При анализе селективности в отношении изоформ фермента обнаружено, что 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин в виде соли СНК-578 обладает равнозначной ингибирующей активностью ЦОГ-1 и ЦОГ-2 (таблица 24).

Таблица 24 – Селективность ингибирования ферментов ЦОГ-1/ЦОГ-2

Соединение	IC_{50} COX-1, мкМ	IC_{50} COX-2, мкМ	COX-2/COX-1
СНК-578	7,796	6,225	0,80

Таким образом, в бесклеточной системе доказано наличие ингибирующего действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в отношении активности ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2, определена концентрационная зависимость действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на активность ферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2, рассчитана предположительная селективность ингибирования солью СНК-578 изоформ фермента ЦОГ. Так как индекс селективности достаточно низкий, то можно сказать, что СНК-578 демонстрирует примерно одинаковую аффинность к изоформам ЦОГ.

3.3.2 Изучение влияния 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде соли (СНК-578) в сравнении с доксорубицином на клеточный цикл Т-лимфобластной лейкемии человека (линии Jurkat)

Клетки Jurkat инкубировали в течение 24 или 48 часов совместно с доксорубицином в концентрации 10^{-5} М или СНК-578 в концентрациях 10^{-5} М или 10^{-4} М.

По результатам экспериментов установлено, что инкубация клеток культуры Jurkat с доксорубицином и солью СНК-578 в течение 24 часов (таблица 25) не приводит к изменению клеточного цикла по сравнению с интактным контролем. При инкубации клеток в течение 48 часов (таблица 26) было определено, что под действием доксорубицина в концентрации 10^{-5} М и СНК-578 в концентрации 10^{-4} М увеличивается доля клеток, находящихся в G1 фазе клеточного цикла, и уменьшается доля клеток, находящихся в S фазе клеточного цикла. При этом доля клеток в G1 у доксорубицина была выше, чем в группе СНК-578 10^{-4} М.

Таблица 25 – Влияние доксорубицина и СНК-578 на клеточный цикл при инкубации в течение 24 часов

Группа, n=8	G1, %	S, %	G2, %	M, %
Контроль	50,63±6,98	33,85±3,33	10,51±5,3	3,42±1,96
Доксорубицин 10^{-5} М	51,50±7,81	35,65±7,78	8,47±0,36	4,48±0,94
СНК-578 10^{-4} М	50,40±7,16	35,50±4,69	9,98±3,94	3,17±1,79
СНК-578 10^{-5} М	50,58±7,24	35,18±3,88	9,91±4,84	3,02±1,49

Примечания:

n-количество наблюдений;

* – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с контролем;

a – $p < 0,05$ по критерию Тьюки сравнению с группой СНК-578 10^{-4} М.

Таблица 26 – Влияние доксорубицина и СНК-578 на клеточный цикл при инкубации в течение 48 часов

Группа, n=8	G1, %	S, %	G2, %	M, %
Контроль	53,50±3,27	28,33±2,61	11,37±3,36	6,80±5,75
Доксорубицин 10^{-5} М	67,25±1,92 ^a *	18,61±1,44*	9,71±2,05	4,43±2,67
СНК-578- 10^{-4} М	59,85±2,25*	20,75±2,05*	12,72±4,4	7,68±5,46
СНК-578 - 10^{-5} М	55,40±3,24	26,90±3,33	12,26±2,91	5,44±5,00

Примечания:

n – количество наблюдений;

* – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с контролем,

a – $p < 0,05$ по критерию Тьюки сравнению с группой СНК-578 10^{-4} М.

Таким образом, согласно полученным данным инкубация клеток Jurkat с доксорубицином в концентрации 10^{-5} М и с СНК-578 в концентрации 10^{-4} М приводит к

остановке клеточного цикла в фазе G1/S, что, возможно, является одним из механизмов противоопухолевого действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в форме соли.

Полученные результаты опубликованы в статье с соавторами:

Журиков, Р.В. Влияние 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина гидрохлорида с противоопухолевой активностью на фазы клеточного цикла на модели Jurkat / **Р.В. Журиков,** А.А. Соколовская, Л.П. Коваленко, Л.Г. Колик // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2026 – №1 – С.20-24.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Производные пириимидина нашли свое применение в лечении инфекционных, хирургических, неврологических, онкологических заболеваний и представляют собой группу химических веществ с широким спектром фармакологической активности и рассматриваются как основа для синтеза новых противоопухолевых и противовоспалительных соединений.

Впервые противоопухолевые свойства 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипириимидина были выявлены в процессе фармакологического скрининга производных 5-оксипириимидина и 3-оксипириидина на модели перевиваемой эпидермоидной карциномы легкого Льюиса в диссертационной работе Кузнецовой О.С. [15]. В этой же работе Кузнецовой О.С. было проведено сравнительное исследование эффектов 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипириимидина в виде основания (СНК-411) и субстанций противоопухолевых препаратов с доказанной цитотоксической активностью в отношении эритромиелоидной лейкемии К-562 *in vitro* в МТТ-тесте. При скрининге в ряду других производных 5-оксипириимидина именно 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипириимидин в виде основания (СНК-411) показал свою эффективность в реакциях пассивной гемагглютинации, гиперчувствительности замедленного типа, фагоцитоза, индуцированного воспаления на конканавалин А у мышей. Также в диссертационной работе Кузнецовой О.С. были исследованы противовоспалительные свойства производного 5-оксипириимидина (СНК-411) в зависимости от дозы, пути введения и вида экспериментальных животных на моделях острого экссудативного воспаления. По результатам данных исследований были выбраны оптимальные дозы и пути введения СНК-411. Так как основание СНК-411 плохо растворяется в воде при комнатной температуре в дальнейшем был проведен синтез хорошо растворимого гидрохлорида 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипириимидина (СНК-578). В последующих исследованиях Кузнецовой О.С. и Коржовой К.В. *in vivo* на разных моделях было показано, что СНК-578 демонстрирует эффективность в дозах меньших, чем СНК-411, что может объясняться более высокой биодоступностью СНК-578 [8-14].

В качестве препаратов для использования в сочетанном применении с 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипириимидином были выбраны доксорубцин и гемцитабин, так как они являются классическими цитостатиками, которые активно используются в

химиотерапии злокачественных новообразований. Актуальным является поиск способов снижения дозировок доксорубина, так как он обладает высокой токсичностью. По данным литературы известно, что колоректальный рак и меланома обладают устойчивостью к терапии доксорубином, а поиск способов преодоления устойчивости является перспективным направлением исследований [119, 202]. Гемцитабин – производное пиримидина, цитостатик, применяющийся в химиотерапии рака молочной железы [1]. Одним из распространенных побочных эффектов применения цитостатиков является развитие миелосупрессии, с такими проявлениями как анемия, тромбоцитопения и лейкопения [68]. В данном исследовании было изучено сочетанное применение гемцитабина и доксорубина с 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидином, с целью оценить возможность усиления противоопухолевого эффекта цитостатиков и предотвращения развития анемии.

Согласно данным литературы, механизм действия фторсодержащих производных пиримидина, относящихся к антиметаболитам, заключается в том, что дезоксирибозиды конкурируют с нормальными нуклеозидами, что вызывает изменение ДНК, приводя к апоптозу. При применении фторурацила ингибируется образование тимидилата из урацила, который является предшественником тимидиндифосфата, необходимого для синтеза ДНК. В процессе синтеза РНК транскрипционные ферменты ядра могут ошибочно включить в нее 5-фторуридиндифосфат вместо уридиндифосфата, что нарушает процессинг РНК и синтез белка [19]. Одной из важных характеристик механизма действия противоопухолевых средств является их способность влиять на фазы клеточного цикла. Характеристика цитостатиков с противоопухолевой активностью, начинается с определения блокировки фазы или фаз клеточного цикла, что позволяет определить его место для дальнейшего использования в комбинированной химиотерапии опухолей. В данной работе было установлено, что при культивировании в течение 48 часов клеток Jurkat (клеточной линии Т-лимфоцитарной лейкемии человека) с доксорубином в концентрации 10^{-5} М и с 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидином в виде соли (СНК-578) в концентрации 10^{-4} М, доксорубин и СНК-578 снижали долю клеток в S фазе клеточного цикла. Согласно данным литературы, ингибирование доксорубином наблюдалось также и в других фазах клеточного цикла [27]. Исследования генотоксичности 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина косвенно показывают, что он не проявляет генотоксичность, а значит механизм действия

напрямую не связан с нарушениями в структуре ДНК. Вероятнее всего влияние на клеточный цикл опосредовано ингибирующим действием 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на активность сигнального пути JAK/STAT3.

В ранее проведенных исследованиях основание СНК-411 стимулировало противоопухолевой иммунный ответ, вызывая увеличение содержания Т-цитотоксических лимфоцитов в крови и НК клеток в крови и в печени мышей. При прямом контакте НК-клеток с опухолевыми клетками они могут оказывать противоопухолевое действие в результате прямой цитотоксичности, высвобождая медиаторы гибели перфорин и гранзим, при непрямом контакте натуральные киллеры оказывают противоопухолевой эффект за счет связывания рецептора TRAIL-активированных НК-клеток с его лигандами (TRAIL-R) на поверхности клеток мишеней, что инициирует их апоптоз [15]. При изучении результатов микроскопирования легких мышей с LLC нами были выявлены нарушения гистоархитектоники, в частности легкие были инфильтрированы полиморфноядерными лейкоцитами с массивным скоплением атипичных клеток. При введении 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина воспалительный процесс менее выражен, выявлен рост соединительной ткани вокруг вторичных опухолевых узлов, что является важной характеристикой противоопухолевого иммунного ответа [10].

Таким образом, приводящие к смерти опухолевых клеток, механизмы действия фторпиримидинов и 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина различны.

В настоящее время идет активный поиск среди производных пиразоло[1,5-а]пиримидина, обладающих противоопухолевой, противовоспалительной, противодиабетической и противовирусной активностью. Согласно данным Almansa C. с соавторами, 2001 синтез и оценка противовоспалительных свойств ряда производных пиразоло[1,5-а]пиримидина определил соединение, включающее метилпиразолпиримидин, продемонстрировавшее мощное и селективное ингибирование ЦОГ-2 [32]. Согласно данным литературы, неселективные ингибиторы циклооксигеназы и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 снижают частоту развития опухолей и метастазирования при новообразованиях молочной железы и желудочно-кишечного тракта [20, 22].

На экспериментальных моделях в опытах *in vivo* у 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина была определена противовоспалительная

активность. В данной работе при анализе активности ЦОГ-1 и ЦОГ-2 было обнаружено, что 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин в виде соли (СНК-578) является неселективным ингибитором ЦОГ. В ранее проведенных опытах при изучении противовоспалительной активности на модели экссудативного воспаления на конканавалин А в опытах на мышах линии СВА было показано, что в контроле индекс реакции воспаления составлял $17,8 \pm 2,1$, при в/б введении мышам основания СНК-411 подавление реакции воспаления было значимым начиная с дозы 10 мг/кг (индекс реакции $8,7 \pm 2,1$), в дозе 25 мг/кг (эквивалент 30 мг/кг СНК-578) определили максимальное подавление реакции воспаления (индекс реакции $6,0 \pm 2,3$), начиная с дозы 50 мг/кг (эквивалент 60 мг/кг СНК-578) противовоспалительная активность основания СНК-411 начинала снижаться (индекс реакции $9,5 \pm 2,3$). При пероральном введении СНК-411 противовоспалительное действие начало снижаться с дозы 100 мг/кг (эквивалент 120 мг/кг СНК-578) [8]. В связи с этим, при применении СНК-411 в дальнейших исследованиях использовали дозу 25 мг/кг.

Полученные результаты позволяют предполагать, что одним из механизмов поликомпонентного действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина является ЦОГ-опосредованная противовоспалительная активность соединения.

В данной работе на модели меланомы В16 при имплантации 5 млн. клеток мышам линии С57ВL/6, курсовое введение СНК-411, СНК-578 или их сочетанное применение с доксорубицином вызывало выраженное антиметастатическое действие [(СНК-411 ИИМ-77,5-92,3); (СНК-578+доксорубицин - ИИМ-98,9%)]. Согласно полученным данным, 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин в форме основания (СНК-411) и соли (СНК-578) соответствует критериям эффективности препаратов, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования. В частности, соединения, обладающие антиметастатической активностью и перспективные для апробации в клинике, должны обладать способностью эффективно ингибировать процесс спонтанного метастазирования в присутствии первичного опухолевого узла на 35-75% [3]. При изучении противоопухолевых свойств 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на модели меланомы В-16 в опытах на мышах линии С57ВL/6 было показано, что соль СНК-578 при совместном введении с доксорубицином значимо подавляет рост опухоли на 11, 15 и 21 сутки ее развития, не вызывая значимого уменьшения объема опухоли при их отдельном введении. Сочетанное применение соли СНК-578 в дозе 10 мг/кг и

доксорубицина в дозе 4 мг/кг вызвало максимальное антиметастатическое действие, индекс ингибирования метастазирования был равен 98,9%. Полученные данные на клеточной линии Jurkat подтверждают возможность усиления противоопухолевого действия при совместном применении СНК-578 и доксорубицина. СНК-411 и СНК-578 в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг при введении в/б показали эквивалентную противоопухолевую и антиметастатическую эффективность на модели меланомы В16.

Известно, что меланома является чрезвычайно агрессивным, активно метастазирующим раком, обладающим высокой устойчивостью к традиционным методам лечения. Передатчик сигнала и активатор транскрипции STAT3 способствует развитию и прогрессированию меланомы, он был подтвержден в качестве эффективной мишени при лечении меланомы [46].

В исследовании, проведенном в.н.с. Л.Ф.Зайнуллиной, было определено, что при преактивации STAT3 ИЛ-6 в течение 6 часов и последующей инкубации клеток с солью СНК-578 (дополнительные 6 часов), ингибируется активность JAK/STAT3 пути. Статистически значимое снижение ДНК-связывающей активности STAT3 обнаруживается при 1 мкМ СНК-578, до $64 \pm 11,0\%$ ($p < 0,01$) от 100% контрольных значений. Увеличение концентрации СНК-578 (10 мкМ) на фоне активации STAT3 цитокином приводит к дополнительному снижению активности транскрипционного фактора до $36 \pm 5,0\%$ ($p < 0,01$, на 64%) по сравнению с контролем. Таким образом, 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин в виде соли (СНК-578) демонстрирует ингибирующее влияние на ИЛ-6-индуцированную ДНК-связывающую активность транскрипционного фактора STAT3 (на 36-64%) в диапазоне концентраций 1-10 мкМ. 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин можно рассматривать в качестве ингибитора STAT3.

Согласно данным литературы, тиеновые пиримидины обладают различными фармакологическими свойствами, включая антибактериальные, противовирусные, противогрибковые, анальгезирующие, противоопухолевые и противовоспалительные [26, 58, 185]. В процессе скрининга различных производных тиеновых пиримидинов были найдены соединения, которые ингибировали индуцированную ИЛ-6 экспрессию STAT3, а также фосфорилирование STAT3 и ERK1/2, стимулированное интерлейкином ИЛ-6 в клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы Нер3В, что подтверждает перспективность изучения поликомпонентных свойств различных производных

пиримидинов и их возможность нарушать фосфорилирование STAT3 [104]. В настоящее время было предпринято много попыток ингибирования STAT3 при разработке и применении новых лекарственных соединений. Подходы различаются от прямого ингибирования STAT3 пептидами, малыми молекулами и бессмысленными олигонуклеотидами до косвенного путем нарушения работы различных элементов сигнального пути STAT3, таких как ИЛ-6 и JAK2. Одной из основных идей прямого нацеливания на STAT3 является предотвращение образования функциональных димеров STAT3 путем нарушения фосфорилирования STAT3. Тем не менее, несмотря на эти шаги в понимании основ механизмов действия сигнального пути STAT3, еще не существует терапевтических агентов, которые бы активно воздействовали на сигнализацию STAT3 клинически значимым образом [207]. В последние годы эффективная терапевтическая стратегия направлена на подавление пролиферации опухолевых клеток, ингибируя активацию сигнальных комплексов, таких как Янус-киназа, и фосфорилирование транскрипционного фактора STAT3, предотвращая инициацию транскрипции сигнальными путями STAT3 и STAT6, которые являются потенциальными терапевтическими мишенями в клинической практике.

В наших исследованиях на модели меланомы B16 было отмечено увеличение индекса ингибирования метастазирования, что вероятно вызвано ингибированием проонкогенного, индуцированного ИЛ-6 сигнального пути STAT3, а также совместным действием СНК-578 с доксорубицином. Установлено, что 20-25% всех онкологических заболеваний возникает в связи с хроническими инфекциями и хроническим воспалением, которые характеризуются высокой концентрацией проонкогенных цитокинов в микроокружении опухоли. При 12 видах онкологических заболеваний уровень провоспалительного ИЛ-6 в сыворотке крови больных коррелирует с прогрессированием заболевания, метастазированием и неблагоприятным прогнозом для общей выживаемости [181].

Согласно данным литературы, микроокружение меланомы обладает иммуносупрессивными свойствами. На 4 (метастатической) стадии развития меланомы появляются нарушения иммунного гомеостаза в виде повышения уровня цитокинов Th2 (ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ИЛ-13) и снижения уровня цитокинов Th1 (ИЛ-2, трансформирующий фактор роста β и интерферон- γ), что указывает о переходе из состояния острого воспаления в состояние хронического воспаления. Активация

T2-иммунного ответа, в котором активно участвуют ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-17, секретируемые клетками в микроокружении опухолей, в частности TAM, способствует росту самой опухоли и эпителиально-мезенхимальному переходу клеток опухоли, что является ключевым компонентом метастазирования. Кроме того, STAT3 способствует развитию и прогрессированию меланомы, он рассматривается в качестве эффективной мишени при лечении меланомы.

При онкологических заболеваниях ИЛ-4 действует через STAT6 сигнальный путь, увеличивает резистентность к CD95-зависимому апоптозу раковых клеток. В микроокружении солидных опухолей обнаружено повышенное содержание ИЛ-4, который вызывает активацию развития TAM. В первичной опухоли TAM макрофаги микроокружения под влиянием ИЛ-4 способствуют инвазии метастатических опухолевых клеток [189].

Колоректальный рак (КРР) – третий по распространенности в мире среди онкологических заболеваний. Согласно данным литературы, процессу онкогенеза и прогрессирования аденокарциномы толстого кишечника способствует T2-воспаление, опосредованное такими провоспалительными Th2 цитокинами как плеiotропный ИЛ-4 и ИЛ-13, которые участвуют в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника [41].

В данной работе на мышах линии BALB/c на модели рака толстой кишки АКАТОЛ при 14-ти дневном пероральном введении 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде основания СНК-411 в дозе 25 мг/кг на 21 день опыта ТРО составило 74%, на 28-е сутки ТРО составило 67%. При введении соли СНК-578 в/б в дозе 10 мг/кг на 21 день опыта ТРО также составило 74%, на 28-е сутки – 64%. При двукратном введении доксорубицина в/б в дозе 5 мг/кг на 21-й день опыта ТРО составило 82%, на 28 сутки 69%, однако 2 из 12 животных погибли. Сочетанное применение 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина с доксорубицином приводило к повышенному ТРО по сравнению с монотерапией доксорубицином при отсутствии гибели животных на ранних сроках наблюдения. Таким образом, основание СНК-411, соль СНК-578 и их сочетанное применение с доксорубицином продемонстрировали противоопухолевую активность по показателям ТРО и УПЖ. При этом СНК-411 в дозе 25 мг/кг (эквивалент 30 мг/кг СНК-578) и СНК-578 в/б в дозе 10 мг/кг продемонстрировали сходный противоопухолевый эффект. Полученные результаты согласуются с данными о противоопухолевой активности

2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина, полученными ранее на моделях рака шейки матки РШМ-5 и карциномы легкого Льюиса. Аденокарцинома толстой кишки АКАТОЛ стала третьей солидной опухолью, при которой через 7 суток после окончания введения соли СНК-578 ТРО было больше 70%, что соответствует критерию эффективности для соединений нового класса, обладающих противоопухолевой активностью и рекомендуемых для дальнейшего клинического изучения [24].

В проведенном исследовании у самок линии С57В1/6 опухоленосителей аденокарциномы молочной железы Са755 курсовое введение основания СНК-411 и соли СНК-578 совместно с двукратным введением гемцитабина (в суммарно дозе 150 мг/кг) препятствовало угнетению кроветворения и развитию анемии у мышей с аденокарциномой Са755, что является одним из важных показателей поликомпонентного механизма противоопухолевого действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина. Через 7 дней после 14-ти дневного введения СНК-411 ТРО составило 45%, у СНК-578 ТРО составило 53%, введение гемцитабина вызывало ТРО на 61%. При курсовом введении СНК-411 совместно с двукратным введением гемцитабина ТРО составило 79%. Совместное введение соли СНК-578 с гемцитабином вызывало торможение роста опухоли на 80%. УПЖ при введении гемцитабина составило 44%, при введении основания СНК-411 УПЖ составило 18%, при введении соли СНК-578 УПЖ составило 21%. Совместное введение гемцитабина с основанием СНК-411 вызывало УПЖ на 62%, сочетание введения соли СНК-578 с гемцитабином вызывало УПЖ на 71%. Сочетанное применение гемцитабина с 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидином позволила получить выраженный противоопухолевый эффект без проявлений гематотоксичности. При введении основания СНК-411 с гемцитабином содержание гемоглобина повысилось на 62%, а количество эритроцитов на 78% по сравнению с показателями мышей группы активного контроля с аденокарциномой Са755. В группе совместного введения соли СНК-578 с гемцитабином содержание гемоглобина было повышено на 69%, а количество эритроцитов на 86% по сравнению с активным контролем. На данной модели СНК-411 в дозе 25 мг/кг (эквивалент 30 мг/кг СНК-578) и СНК-578 в дозе 10 мг/кг оказали одинаковое влияние как на ТРО, так и на гематологические показатели мышей с аденокарциномой Са755. Анемия является независимым фактором, негативно влияющим на развитие онкологического заболевания, выживаемость онкологических больных, увеличивая риск прогрессирования и ухудшая чувствительность опухолевых

клеток к химиотерапии. Одним из проявлений миелотоксичности цитостатиков служит эритроцитопения с усилением анемии, часто обусловленной самим опухолевым процессом. При злокачественных новообразованиях анемия выявляется у 30-40% пациентов на момент постановки диагноза и примерно у 50-70 % пациентов, получающих химиотерапию [68]. Анемия у онкобольных может развиваться не только вследствие побочных эффектов цитостатиков, но и из-за дефицита железа, дефицита витамина В12, хронической кровопотери, метастатического поражения костного мозга, а также хронического воспаления [125]. По данным клинических исследований, при монотерапии гемцитабином рака молочной железы одним из основных видов побочного действия является миелосупрессия.

2-Изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин является ингибитором ЦОГ-1 и ЦОГ-2, способствуя снижению экспрессии матриксных протеиназ, снижает концентрации проонкогенных цитокинов ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-17А в сыворотках крови мышей-опухоленосителей, а также ингибирует индуцированный интерлейкином ИЛ-6 центральный онкогенный сигнальный путь JAK/STAT3. Согласно данным литературы, ИЛ-6 через сигнальный путь JAK-STAT3 регулирует работу сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, активация которого совместно с низкой доступностью аминокислот на поздних стадиях онкологических заболеваний приводит к нарушению созревания эритроцитов, что ведет к анемии [125]. Таким образом, предположительно можно описать механизм гематопротекторного действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на модели аденокарциномы молочной железы Ca755.

В другой серии экспериментов, проводившихся в данной работе на крысах, введение 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина крысам с адьювантным артритом повышало содержание гемоглобина и количество эритроцитов в крови и увеличивало пройденное расстояние. Введение диклофенака приводило к значимому снижению содержания эритроцитов (на 32 %), гемоглобина (на 15%) и, соответственно, уровня гематокрита по сравнению с интактным контролем. В группах, которым вводили основание СНК-411 в дозах 25 и 40 мг/кг, отмечено улучшение показателей красной крови, по сравнению с данными контрольных групп. Установлено, что показатели периферической крови крыс после введения соли СНК-578 в дозах 10 и 25 мг/кг были на уровне групп, которым ввели основание СНК-411 в дозах 25 (эквивалент 30 мг/кг СНК-578) и 40 мг/кг (эквивалент 48 мг/кг СНК-578).

Кроме того, курсовое введение 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в форме основания и соли в дозе 25 мг/кг вызывало уменьшение гипералгезии правой лапы с артритом на 15-й день опыта - 5 день развития адьювантного артрита, курсовое введение диклофенака в дозе 5 мг/кг обладало анальгетической активностью на 15 и 24 дни опыта. При измерении отека левого скакательного сустава было определено, что диклофенак в дозе 5 мг/кг и соль СНК-411 в дозе 40 мг/кг значительно снижает отечность сустава на 11 сутки наблюдения. На 14 и 22 сутки наблюдения на инфракрасном актиметре курсовое введение диклофенака в дозе 5 мг/кг и основания СНК-411 в дозе 40 мг/кг (эквивалент 48 мг/кг СНК-578) увеличивает пройденное расстояние по сравнению с активным контролем. У животных, которым вводили диклофенак, в конце опыта определено достоверное уменьшение прироста массы тела по сравнению с интактным контролем. На данной модели СНК-411 в более высокой дозе по сравнению с СНК-578 продемонстрировало более выраженные противовоспалительные свойства, в остальном эффективность обеих форм была одинаковой.

Хроническое воспаление вызывает нарушение иммунологического гомеостаза, при котором ряд цитокинов участвуют во многих иммунопатологических процессах, в частности плеiotропный ИЛ-4, а также ИЛ-13, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-17А. К клиническим проявлениям Th2 ответа при аллергии относятся анафилактические реакции, бронхиальная астма, аллергический ринит, поллинозы, атопическая экзема и другие, к характерным признакам которых относятся эозинофилия и повышенный синтез IgE. Необходимость в лекарственных средствах, подавляющих избыточную активность T2-иммунного ответа для использования в терапии IgE-зависимых патологий достаточно очевидна, поэтому актуален поиск соединений, направленных на коррекцию баланса Th1/Th2 хелперных лимфоцитов и цитокинов. При бронхиальной астме таргетная терапия в виде препарата дупилумаб, который является блокатором ИЛ-4 и ИЛ-13, применение препаратов меполизумаб и реслизумаб (моноклональные антитела к ИЛ-5) при эозинофильной астме вызывают подавление воспалительных каскадов, инициированных различными T2-клетками [16]. Идет активный поиск соединений, регулирующих баланс Th1/Th2 цитокинов, в частности было показано, что Гинзенозид Rh1 (G-Rh1), который является одним из основных биологически активных соединений, извлеченных из красного женьшеня, снижает содержание ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-33 и

стабилизирует содержание ИФН- γ и ИЛ-12 у мышей с бронхиальной астмой, индуцированной овалбумином [160].

В данной диссертационной работе 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин при введении в/б в виде основания (СНК-411) и соли (СНК-578) в дозах 10 мг/кг и 50 мг/кг демонстрирует противоаллергическую активность, сопоставимую с дезлоратадином (Эриус), подавляя реакцию системной анафилаксии на овалбумин у мышей BALB/c и снижая концентрации IgE и ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-11, ИЛ-6. 2-Изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин и дезлоратадин, при курсовом 7-дневном введении сенсibilизированным овалбумином мышам, значительно снижали содержание Th2 цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13. Введение дезлоратадина в дозе 1,3 мг/кг снижало содержание проаллергических цитокинов, но не вызывало значимого снижения концентрации IgE в сыворотке крови сенсibilизированных мышей. Введение основания СНК-411 и соли СНК-578 в дозе 25 мг/кг и 50 мг/кг вызывало значимое подавление системной реакции анафилаксии и содержания IgE в сыворотке крови мышей BALB/c в 1,5 – 1,6 раз. По мнению академика А.С.Симбирцева, антицитокиновая терапия при различных формах аллергии в настоящее время представляется перспективной [23]. На данной модели СНК-411 и СНК-578 продемонстрировали эквивалентные противоаллергические свойства.

Наличие противоаллергического действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина указывает на возможность их совместного применения с высокомолекулярными противоопухолевыми и другими таргетными препаратами, а также при различных нарушениях Th1/Th2 цитокинового баланса. Согласно данным экспериментальных и клинических исследований, представленных в обзоре А.А. Никольского с соавт. (2021 г.) животные и пациенты с тяжелой формой нейтрофильной бронхиальной астмы плохо поддавались традиционному лечению кортикостероидами, введение ингибиторов STAT3 приводило к уменьшению ремоделирования бронхов, снижению воспаления и количества провоспалительных цитокинов в лёгких, включая ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и ИЛ-17А. Инактивация STAT3 нивелировала как Th17-, так и Th2-иммунный ответ в лёгких. Учитывая гетерогенность механизмов бронхиальной астмы, блокирование двух иммунных ответов одновременно является перспективным подходом для разработки противовоспалительных препаратов различного генеза [17].

Полученные данные определяют перспективы дальнейшей разработки 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в качестве средства для совместного применения с таргетными противоопухолевыми препаратами при T2-воспалении у онкологических больных. При раке молочной железы подавление T2-цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-5 японским противоастматическим препаратом Tosilart IPD (Topical suplatast tosilat) в сочетании с ингибиторами иммунных контрольных точек является многообещающим терапевтическим подходом в химиотерапии опухолей [55]. Таким образом, данные литературы последних лет указывают на перспективность совместного применения препаратов, снижающих концентрации Th2-проонкогенных и проаллергенных цитокинов, с ингибиторами контрольных точек у онкобольных с T2-воспалением.

В настоящее время проводится экспериментальный поиск структур с желаемой терапевтической и фармакологической активностью среди производных пиразоло[1,5-а]пиримидина, состоящих из двух гетероциклов пиразола и пиримидина, для нахождения соединений с выраженной противоопухолевой и противовоспалительной активностью. Сочетанная противоопухолевая, противовоспалительная и иммуностропная активность 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина делает его перспективной основой для создания лекарственных средств. Комплексный механизм действия, как показывают данные, во многом обусловлен ингибированием ключевого провоспалительного фактора ИЛ-6 и опосредуемого им онкогенного пути JAK-STAT3, через который ИЛ-6 регулирует работу сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, активация которого в свою очередь ведет к анемии [125]. Полученные данные позволяют предположить механизм действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на метастазирование при меланоме B-16, а также нормализацию содержания эритроцитов и гемоглобина, которые оставались на уровне интактного контроля у самок мышей с аденокарциномой молочной железы Ca755 и у крыс с адьювантным артритом.

Ингибиторы циклооксигеназ значительно снижают риск рецидива и смертности от рака молочной железы и воспалительных заболеваний кишечника, подавление Th2 и Th17 хелперного ответа также является важным свойством противоаллергического и противоонкогенного действия СНК-411 и СНК-578.

Основание СНК-411 и соль СНК-578 обладают выраженной противоаллергической активностью, сопоставимой с дезлоратадином, подавляя реакцию

системной анафилаксии на овалбумин у мышей BALB/c, снижая уровни IgE и ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-11, ИЛ-6 в сыворотке крови сенсibilизированных к овалбумину мышей.

Таким образом, торможение роста опухоли и метастазирования на различных моделях солидных опухолей, подавление системной анафилаксии, снижение уровней IgE, проаллергенных и проонкогенных Th2-цитокинов под действием 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина, улучшение показателей крови на модели аденокарциномы молочной железы Ca755 у мышей и на модели аутоиммунного адьювантного артрита у крыс, а также ингибирование ЦОГ-1 и ЦОГ-2 подтвердили наличие противоопухолевых, противоаллергических и противовоспалительных свойств у 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина и его поликомпонентный механизм действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

2-Изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин в форме основания (СНК-411) и соли (СНК-578) обладает противоаллергенной активностью, подавляя реакцию системной анафилаксии на овальбумин у мышей BALB/c и снижая концентрации иммуноглобулина IgE, проаллергенных цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-11, ИЛ-6. С 2021 года в России при тяжелых формах атопической БА применяются таргетные препараты против ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13 и IgE, однако они обладают рядом побочных эффектов [23]. 2-Изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин снижает концентрации всех основных Th2-цитокинов, является ингибитором ЦОГ-1 и ЦОГ-2, ингибирует индуцированный ИЛ-6 сигнальный путь STAT3, подавление которого необходимо и при нейтрофильной форме БА [17]. Наличие побочных иммунологических эффектов у ингибиторов контрольных точек, а также ограниченность сферы их применения в условиях иммуносупрессивного микроокружения с преобладанием Т2-воспаления, указывает на возможность их совместного применения с 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидином. Согласно данным литературы, при раке молочной железы снижение концентрации ИЛ-4 и ИЛ-5 противоастматическим препаратом Tosilart IPD в сочетании с ИКТ является многообещающим терапевтическим подходом в иммунотерапии [55]

Полученные на 3-х моделях солидных опухолей экспериментальные данные об антипролиферативном и антиметастатическом действии 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина определяют перспективы дальнейшей его разработки в качестве средств для терапии солидных опухолей в соответствии с критериями эффективности, приведенными в методических указаниях по доклиническому изучению соединений, обладающих противоопухолевой активностью [24]. Данные, представленные в этой работе о совместном введении малотоксичного 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина с гемцитабином и с доксорубицином, указывают на дальнейшую возможность клинического исследования его применения с цитостатиками при солидных опухолях с целью снижения частоты побочных эффектов и усиления противоопухолевого действия.

В отличие от фторсодержащих пиримидинов, фармакологическая активность 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина реализуется посредством сочетания противоопухолевого, противовоспалительного и иммуностропного действия. Одним из

механизмов противоопухолевого действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина является его способность ингибировать проонкогенный сигнальный путь STAT3, которая вероятно объясняет его влияние на метастазирование меланомы B16, а также нормализацию показателей эритроцитов и гемоглобина на модели аденокарциномы молочной железы Ca755.

В экспериментах, проведенных в данной работе, 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин в форме основания (СНК-411) и соли (СНК-578) показал примерно одинаковую противоопухолевую активность на моделях меланомы B16, аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ и аденокарциномы молочной железы Ca755. При этом основание СНК-411 использовалось в дозе 25 мг/кг, которая эквивалентна 30 мг/кг соли СНК-578, а соль СНК-578 использовалась в дозе 10 мг/кг. На модели системной анафилаксии на овальбумин также эффективность обеих форм 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина была одинаковой как в дозе 10 мг/кг, так и в дозе 50 мг/кг. На модели адьювантного артрита основание СНК-411 и соль СНК-578 также были примерно равны по эффективности, при этом основание СНК-411 использовалось в дозах 25 мг/кг и 40 мг/кг (эквивалент 30 мг/кг и 48 мг/кг СНК-578), а соль СНК-578 использовалась в дозах 10 мг/кг и 25 мг/кг. Таким образом можно сказать, что соль СНК-578 равна по эффективности основанию СНК-411 при в/б пути введения, но в более низких дозировках, что может объясняться её более высокой биодоступностью вследствие хорошей растворимости в воде.

В таблице 27 представлена сравнительная характеристика 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в форме основания (СНК-411) и форме соли (СНК-578), из которой можно сделать вывод, что обе формы проявляют одинаковый спектр фармакологической активности, но при этом водорастворимая соль СНК-578 эффективна в меньших дозировках.

Таблица 27– Сравнительная характеристика 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина в виде основания и соли

Характеристика свойств	Основание СНК-411	Соль СНК-578
Растворимость	Растворим в воде при +70°С	Растворим в воде при комнатной температуре
Противовоспалительные свойства на модели отека на конканавалин А и каррагенан	Оптимальная доза 25 мг/кг в/б	Оптимальная доза 10 мг/кг в/б
Ингибирование ЦОГ-1 и ЦОГ-2		Неселективный ингибитор ЦОГ-1 и ЦОГ-2
Влияние на клеточный цикл Jurkat		Снижение доли клеток в S фазе
Противоопухолевое действие на модели на аденокарциномы Са755 через 7 дней после окончания введения:	25 мг/кг, в/б - ТРО 45%	10 мг/кг, в/б - ТРО 53%
Противоопухолевое действие на модели на АКАТОЛ через 7 дней после окончания введения:	25 мг/кг, per os - ТРО 74%	10 мг/кг, в/б - ТРО 74%
Антиметастатическое действие на модели меланомы В-16-ИИМ:	10мг/кг, в/б- 72%; 25мг/кг, в/б -83%; 10мг/кг, в/б- +DOX - 97%;	10мг/кг, в/б- 76%; 25мг/кг, в/б -92%; 10мг/кг, в/б- +DOX -99%;
Противоаллергическое действие на модели системной реакции анафилаксии на овальбумин	25мг/кг, 50 мг/кг Подавление системной анафилаксии и снижение концентрации IgE в 1,5 раз	25мг/кг, 50 мг/кг Подавление системной анафилаксии и снижение концентрации IgE в 1,6 раз
Снижение концентрации цитокинов на модели системной реакции анафилаксии	ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13, ИЛ-17А	ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-13, ИЛ-11

ВЫВОДЫ

1. 2-Изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин проявляет выраженную антиметастатическую активность на модели меланомы В16 в виде основания (СНК-411) в дозе 25 мг/кг и в виде соли (СНК-578) в дозе 10 мг/кг как в виде монотерапии, так и при сочетанном применении с доксорубицином в дозе 4 мг/кг.

2. 2-Изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин при 14-ти дневном введении как в виде основания (СНК-411) *per os* в дозе 25 мг/кг, так и в виде соли (СНК-578) в/б в дозе 10 мг/кг обладает способностью к торможению роста аденокарциномы толстой кишки АКАТОЛ более чем на 70% как при монотерапии, так и при сочетанном применении с доксорубицином (двукратное введение; доза 5 мг/кг).

3. 2-Изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин при сочетанном применении с гемцитабином на модели аденокарциномы молочной железы Са755 демонстрирует противоопухолевый эффект, увеличивает продолжительность жизни и предотвращает развитие анемии у мышей-опухоленосителей.

4. В опытах на мышах BALB/c на модели системной реакции анафилаксии на овальбумин показано, что 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин обладает противоаллергической активностью и снижает содержание иммуноглобулина Е, ИЛ-6 и Th2-цитокинов в сыворотке крови.

5. На модели адьювантного артрита 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин как в виде основания (СНК-411) в дозе 40 мг/кг, так и в виде соли (СНК 578) в дозе 25 мг/кг проявляет умеренные анальгетические и противовоспалительные свойства, также 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин повышает концентрацию гемоглобина в крови животных по сравнению с показателями крыс интактного контроля.

6. Исследования механизма противовоспалительного действия 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина показали, что СНК-578 ингибирует активность как циклооксигеназы-1, так и циклооксигеназы-2. На модели экссудативного отека, индуцированного полным адьювантом Фрейнда, 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин демонстрирует противовоспалительную активность.

7. Показано, что 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин в виде соли (СНК-578), как и доксорубицин, приводит к остановке клеточного цикла линии лимфобластной лейкемии Jurkat в фазе G1/S и не обладает генотоксичностью.

8. Согласно полученным данным, более перспективной для дальнейшего изучения формой 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина является его гидрохлорид (СНК-578).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

2-Изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин в виде соли (СНК-578) обладает широким спектром фармакологической активности и поликомпонентным механизмом действия, является перспективным для дальнейшего углубленного изучения механизмов его действия на T2 воспаление и возможного применения в качестве средства, дополняющего противоопухолевую химиотерапию.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- альфа-ГФДГ – альфа-глицерофосфат-дегидрогеназа
АМФК – аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа
АТД – атопический дерматит
в/б – внутрибрюшинно
БА – бронхиальная астма
БК – болезнь Крона
ВЗК – воспалительные заболевания кишечника
ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
ДК – дендритные клетки
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
дУМФ – дезоксиуридинмонофосфат
ИИМ – индекс ингибирования метастазирования
ИКТ – ингибиторы контрольных точек
ИЛ – интерлейкин
ИФН – интерферон
КонА – конканавалин А
КРР – колоректальный рак
МАИР – международное агентство изучения рака
НК – натуральные киллеры
НЯК – неспецифический язвенный колит
ПАФ – полный адъювант Фрейнда
ПГ - простагландины
РМЖ – рак молочной железы
РНК – рибонуклеиновая кислота
СПЖ – средняя продолжительность жизни
ТРО – торможение роста опухоли
ТСЛП – тимусный стромальный лимфопоэтин
УПЖ – увеличение продолжительности жизни

ФНО- α – фактор некроза опухоли α

ХПРС – хронический полипозный риносинусит

ЦОГ – циклооксигеназа

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

CD – кластер дифференциации

CSF-1 – макрофагальный колониестимулирующий фактор

CTLA4 – ингибирующий иммунный ответ клеточный рецептор

COX – циклооксигеназа

DMSO – диметилсульфоксид

ЕААСИ – европейская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

ELISA – иммуноферментный анализ

ER – рецептор эстрогена

FDA – управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств

IC50 – концентрация вещества, вызывающая ингибирование активности фермента на 50%

IL – интерлейкин

ILC-2 – лимфоидные клетки врожденного иммунитета 2-го типа

IgE – иммуноглобулин E

In situ – локально

In vivo – в живом организме

In vitro – в пробирке

JAK – тирозинкиназа

HCP – тяжелая степень метастатического поражения органа

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2

LCP – легкая степень метастатического поражения органа

M1 – опухоль-ассоциированные макрофаги M2-типа

M2 – опухоль-ассоциированные макрофаги M2-типа

MDSC – супрессорные клетки миелоидного происхождения

NKT – CD56⁺CD3⁺ клетки врожденного иммунитета

PD-L1 – лиганд рецептора, вызывающего апоптоз клеток

Per os – перорально

PR – рецептор прогестерона

SA-PE – стрептавидин, конъюгированный с фикоэритрином

STAT – сигнальный белок, трансдуктор и активатор транскрипции

TAM – опухоль-ассоциированные макрофаги

TAN – опухоль-ассоциированные нейтрофилы

Th – лимфоцит Т-хелпер

Th17 – Т-хелпер, секретирующий ИЛ-17

TIL – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

Treg – регуляторный Т-лимфоцит

TMPD – субстрат для колориметрии N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин

TNBC – трижды негативный рак молочной железы

TNF – фактор некроза опухоли

VEGFA – васкулярный эндотелиальный фактор роста А

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ассоциация онкологов России, Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация "Российское общество онкопатологов". Клинические рекомендации Минздрава РФ. Рак молочной железы [электронный ресурс] – Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/379_4 Дата обращения: 17.07.2025
2. Ассоциация онкологов России, Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», Общероссийская общественная организация "Российское общество онкопатологов". Клинические рекомендации Минздрава РФ. Рак пищевода и кардии [электронный ресурс] – Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/237_6. Дата обращения: 10.06.2025
3. Зуева, В.П. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под редакцией Р.У. Хабриева / В.П. Зуева В.П., А.М. Козлов, Г.К. Герасимова [и др.] – Москва: издательство «Медицина», 2005. – С. 674-682
4. Дарвиш, Ф. Производные пиразоло[1,5-а]пиримидина и их биологическая активность / Ф. Дарвиш, Д.С. Новикова, Т.А. Григорьева [и др.] // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2024. – Т.70, №96. – С. 53-62
5. Доброва, Н.В. Предварительные результаты использования фторафура с иринотеканом и оксалиплатином у пациентов с распространенным колоректальным раком. / Н.В. Доброва, Э.А. Аратюнян, И.Н. Полушкина [и др.] // Онкологическая колопроктология. – 2017– Т.7, №4. – С. 44-53
6. Измайлов, А.Г. Производные пиримидинового ряда в хирургической практике. // Современная медицина. – 2018. – Т.10, №2. – С. 177-182
7. Каркищенко, Н.Н. Лекарственная профилактика. / Н.Н. Каркищенко – Москва: издательство «Воентехлит», 2001, С. 751

8. Коваленко, Л.П. Противовоспалительная и противоаллергенная активность производных 5-оксипиримидина / Л. П. Коваленко, К.В. Коржова, С.В. Никитин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т.83, №10. – С.22-25.

9. Коваленко, Л.П. Влияние производных 5-оксипиримидина на рост опухоли и содержание интерлейкинов в сыворотке крови самок мышей линии СВА с раком шейки матки (РШМ-5) / Л.П. Коваленко, К.В. Коржова, Л.Ф. Зайнуллина [и др.] // Биомедицинская химия. – 2021. – Т.67, №2. – С. 158-161

10. Коваленко, Л.П. Влияние 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина на рост и метастазирование карциномы легкого Lewis у мышей линии C57Bl/6 / Л.П. Коваленко, С.В. Никитин, А.В. Сорокина [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т.83, №1. – С.24-27.

11. Коваленко, Л.П. Коррекция уровня сывороточных проонкогенных цитокинов и метастазирования производными 5-оксипиримидина и доксорубицином после удаления первичного опухолевого узла у мышей с метастазирующим раком лёгкого LLC / Л.П. Коваленко, К.В. Коржова, С.В. Никитин [и др.] // Биомедицинская химия. – 2023. – Т.69, №1. – С. 39-45.

12. Коваленко, Л.П. Противовоспалительная и противоаллергенная активность производных 5-оксипиримидина / Л.П. Коваленко, К.В. Коржова, С.В. Никитин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т.83, №10. – С.22-25.

13. Коваленко, Л.П. Производное 5-оксипиримидина, обладающее противоопухолевой активностью. / Л.П. Коваленко, С.Б. Середенин, С.В. Никитин [и др.] // патент РФ на изобретение RU2518889. Дата публикации: 06.10.2014.

14. Коваленко, Л.П. Средство с противоопухолевой и антиметастатической активностью, противовоспалительным и противоаллергенным действием / Л.П. Коваленко, С.В. Никитин, А.Д. Дурнев [и др.] // патент РФ на изобретение RU2686672. Дата публикации: 30.04.2019.

15. Кузнецова, О.С. Исследование иммунофармакологических свойств и противоопухолевой активности производного 5-оксипиримидина СНК-411: канд. биол. наук: 14.03.06 / Кузнецова Ольга Сергеевна. – М., 2016. – 144 с.

16. Кузубова, Н.А. T2-ассоциированные заболевания: в фокусе коморбидный пациент. / Н.А. Кузубова, О.Н. Титова // Медицинский Совет. – 2020. – №17. – С. 57-64

17. Никольский, А.А. Роль транскрипционного фактора STAT3 в патогенезе бронхиальной астмы. / А.А. Никольский, И.П. Шиловский, Е.Д. Барвинская, А.В. [и др.] // Биохимия. – 2021. – Т.86, №11. – С. 1654-1667.
18. Новикова, Д.С. Разработка воспроизводимого и масштабируемого метода синтеза биологически активных производных пиразоло[1,5-а]пиримидина / Д.С. Новикова, Ф. Дарвиш Ф., Т.А. Григорьева [и др.] // Журн. общей химии. – 2023. – Т.93, №5. – С. 684-694.
19. Платинский, Л.В., Применение фторафура в химиотерапии злокачественных опухолей. / Л.В. Платинский, В.В. Брюзгин // Современная онкология. – 2008. – Т.10, №2. – С. 74-77.
20. Савельева, О.Е. Воспаление как терапевтическая мишень при комплексном лечении злокачественных опухолей / О.Е. Савельева, В.М. Перельмутер, Л.А. Таширева // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Т.16, №3. – С. 65-78.
21. Самотруева, М.А. Фармакологическая активность производных пиримидинов / М.А. Самотруева, А.А. Цибизова, А.Л. Ясенявская [и др.] // Астраханский медицинский журнал. – 2015. – Т.1. – С. 12-29
22. Сергеева, Н.С. Влияние нестероидных противовоспалительных средств на канцерогенез. / Н.С. Сергеева, И.К.Свиридова, Е.А.Кувшинова Е.А. [и др.] // Онкология. Журнал им П.А. Герцена. – 2015. – №4. – С. 72-73.
23. Симбирцев, А.С. Цитокины в иммунопатогенезе аллергии // Русский медицинский журнал- 2021. – Т.5, №1. – С.32-37
24. Трещалина, Е.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Ред. А.Н. Миронова / Е.М. Трещалина, О.С. Жукова, Г.К. Герасимова [и др.] - Москва: общество с ограниченной ответственностью издательство «Гриф и К», 2012. – С. 642 – 656
25. Утешев, Д.Б. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Ред. А.Н. Миронова. Москва: общество с ограниченной ответственностью издательство «Гриф и К», 2012. – С. 486-501.

26. Чиряпкин, А.С. Обзор производных пиримидина как фармакологически активных соединений // *Juvenis scientia*. – 2022. – Т.8, №5. – С. 16-30.
27. Шутов, А.М. Доксорубицин и менадион вызывают задержку клеточной пролиферации *Saccharomyces cerevisiae* с помощью различных механизмов / А.М. Шутов, Ю.В. Саенко, Е.В. Расторгуева // *Цитология*. – 2010. – №5. – С. 407-411
28. Adams, S. Current Landscape of Immunotherapy in Breast Cancer: A Review. / S. Adams, M.E. Gatti-Mays, K. Kalinsky [et al.] // *JAMA Oncol*. – 2019. – Vol.5, No 8. – P. 1205–1214.
29. Agaloti, T. TH17 cell plasticity: The role of dendritic cells and molecular mechanisms. / T. Agaloti T, E.J. Villablanca, S. Huber [et al.]. // *J Autoimmun*. – 2018. – Vol.87. – P. 50-60
30. Akhter, S. Role of Th17 and IL-17 Cytokines on Inflammatory and Autoimmune Diseases. / S. Akhter, F.M. Tasnim, M.N. Islam [et al.] // *Curr Pharm* –2023. – Vol.29, No 26. – P. 2078-2090.
31. Al Mahi, A. RAS pathway regulation in melanoma. / A. Al Mahi, J. Ablain // *Dis Model Mech*. – 2022. – Vol.15, No 2.
32. Almansa, C. Synthesis and SAR of a new series of COX-2-selective inhibitors: Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines. / C. Almansa, A.F. de Arriba, F.L. Cavalcanti [et al.] // *J. Med. Chem*. – 2001. – Vol.44, No 3. – P. 350-361.
33. Al-Sanabra, O.M. Diminishing Hecpidin via Reducing IL-6/STAT3 Pathway by Utilizing Ferulic Acid: An In Vitro Study. / O.M. Al-Sanabra, L.F. Abu-Qatouseh M.I.A. Ahmad [et al.] // *Biomedicines*. – 2025. – Vol.13, No 923.
34. Arias-Gómez, A. Functional pyrazolo [1,5-a] pyrimidines: Current approaches in synthetic transformations and uses as an antitumor scaffold. / A. Arias-Gómez, A. Godoy, J. Portilla // *Molecules*. – 2021. – Vol.26. – P. 2708.
35. Attrill, G.H. The tumour immune landscape and its implications in cutaneous melanoma. / G.H. Attrill, P.M. Ferguson, U. Palendira // *Pigment Cell Melanoma Res*. –2021. – Vol.34, No 3. – P. 529-549.
36. Auzzi, G. 2-Phenylpyrazolo[1,5-a] pyrimidin-7-ones. A New Class of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs Devoid of Ulcerogenic Activity / G. Auzzi, F. Bruni, L. Cecchi // *J. Med. Chem*. – 1983. – Vol.26, No 12. – P. 1706-1709

37. Bagul, C. Synthesis and biological evaluation of chalcone-linked pyrazolo [1,5-a] pyrimidines as potential anticancer agents / C. Bagul, G.K. Rao, V.K.K. Makani // *J. Med. Chem.* – 2017. – Vol.8, No 9. – P. 1810-1816.
38. Bai, B. Therapeutic effects of dihydroartemisinin in multiple stages of colitis-associated colorectal cancer. / B. Bai, F. Wu, K. Ying [et al.] // *Theranostics.* – 2021. – Vol.11. – P. 6225–6239.
39. Bandach, I. Experimental modulation of Interleukin 1 shows its key role in chronic kidney disease progression and anemia. / I. Bandach, Y. Segev, D. Landau [et al.] // *Sci Rep.* – 2021. – Vol.11, No 6288.
40. Bassez, A. A single-cell map of intratumoral changes during anti-PD1 treatment of patients with breast cancer. / A. Bassez, H. Vos, L. Van Dyck [et al.] // *Nat Med.* – 2021. – Vol.27, No 5. – P. 820–832.
41. Birch, R.J. Inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer epidemiology and outcomes: An English population-based study. / R.J. Birch, N. Burr, V. Subramanian [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* – 2022. – Vol.117. – P. 1858–1870
42. Boieri, M. CD4+ T helper 2 cells suppress breast cancer by inducing terminal differentiation. / M. Boieri, A. Malishkevich, R. Guennoun // *J Exp Med.* – 2022. – Vol.219, No 7.
43. Bulkley, G.B. Long-term spontaneous regression of malignant melanoma with visceral metastases Report of a case with immunologic profile. / G.B. Bulkley, M.H. Cohen, P.M. Banks [et al.] // *Cancer.* – 1975. – Vol.36. – P. 485-494
44. Cai, L. Effect of Th9/IL-9 on the growth of gastric cancer in nude mice. / L. Cai, Y. Zhang, Y. Zhang [et al.] // *Onco Targets Ther.* – 2019. – Vol.12. – P. 2225–2234.
45. Calvo, F.A. Neoadjuvant Chemoradiation With Tegafur in Cancer of the Pancreas: Initial Analysis of Clinical Tolerance and Outcome. / F.A. Calvo, R. Matute, J.L. Garcia-Sabrido [et al.] // *American Journal of Clinical Oncology.* – 2004 – Vol.27, No 4. – P. 343
46. Cao, H.H. Inhibition of the STAT3 signaling pathway contributes to the anti-melanoma activities of Shikonin / H-H. Cao, D-Y. Lin, Y-C. Lai [et al.] // *Front. in Pharm.* - 2020. – Vol.11. – A.748
47. Cao, Q. Th1 cells inducing IFN γ response improves immunotherapy efficacy in gastric cancer. / Q. Cao, R. Xue, N. Zhang. // *Chin J Cancer Res.* – 2023. – Vol.35, No 3. – P. 299-315.

48. Cao, Y. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. / Y. Cao, A.T. Pearman, G.A. Zimmerman [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2000. – Vol.97. – P. 11280–11285
49. Cao, Y. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. / Y. Cao, S.M. Prescott // *J. Cell Physiol.* – 2002. – Vol.190. – P. 279–286.
50. Carrega, P. Characterisation of innate lymphoid cell subsets infiltrating colorectal carcinoma. / P. Carrega, P. Orecchia, L. Quatrini [et al.] // *Gut.* – 2020. – Vol.69, No 12. – P. 2261-2263
51. Certo, M. Lactate modulation of immune responses in inflammatory versus tumour microenvironments. / M. Certo, C.H. Tsai, V. Pucino [et al.] // *Nat. Rev. Immunol.* – 2021 – Vol.21. – P. 151–161.
52. Chaudhry, A. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. / A. Chaudhry, R.M. Samstein, P. Treuting [et al.] // *Immunity.* – 2011. – Vol.34, No 4. – P. 566–578.
53. Chen, L. Il-10 secreted by Cancer-Associated macrophages regulates proliferation and invasion in gastric cancer cells Via C-Met/Stat3 signaling. / L. Chen, Y. Shi, X. Zhu [et al.] // *Oncol Rep.* – 2019. – Vol.42, No 2. – P. 595–604.
54. Chen, X.W. Inflammation, cytokines, the IL-17/IL-6/STAT3/NF- κ B axis, and tumorigenesis. / X.W. Chen, S.F. Zhou // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2015 – Vol.9. – P. 2941–2946
55. Chen, Y. Pharmaceutical targeting Th2-mediated immunity enhances immunotherapy response in breast cancer/ Y. Chen, J. Sun, Y. Luo [et al.] // *Journal of Translational Medicine.* – 2022. – Vol.20, No 615.
56. Chevalier, M.F. ILC2-modulated T cell-to MDSC balance is associated with bladder cancer recurrence. / M.F. Chevalier, S. TrabANELLI, J. Racle [et al.] // *J Clin Invest.* – 2017. – Vol.127. – P. 2916–2929
57. Christofi, T. Current perspective in cancer immunotherapy. / T. Christofi, S. Baritaki, L. Falzone [et al.] // *Cancers.* – 2019. – Vol.11. – P.1472.
58. Coen, N. Spectrum of activity and mechanisms of resistance of various nucleoside derivatives against-herpesviruses / N. Coen, S. Duraffour, D. Topalis, R. [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2014. – Vol.58, No 12. – P. 7312–7323

59. Cosmi, L. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4 (+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. / L. Cosmi, L. Maggi, V. Santarlasci [et al.] // *J Allergy Clin Immunol.* – 2010. – Vol.125. – P. 222-230
60. Cyzuci, N. Inhibitory effects of diallyl disulfide or aspirin on 2-amino-1methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced mammary carcinogenesis in rats. / N. Suzui, S. Sugie, K. M. Rahman [et al.] // *Jpn. J. Cancer Res.* – 1997. – Vol.88. – P. 705–711.
61. Czajka-Francuz, P. Serum cytokine profile as a potential prognostic tool in colorectal cancer patients - one center study. / P. Czajka-Francuz, T. Francuz, S. Cison-Jurek // *Rep Pract Oncol Radiother.* – 2020. – Vol.25, No 6. – P.867–75.
62. Dawane, B.S. Design, synthesis, and characterization of some novel pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as potent antimicrobial agents. / B.S. Dawane, S.G. Konda, S.B. Zangade // *J. Heterocyclic Chem.* – 2010. – Vol.47, No 5. – P. 1250-1254.
63. Debenham, J.S. Discovery of N-[Bis(4-methoxyphenyl)methyl]-4-hydroxy-2-(pyridazin-3-yl)pyrimidine-5-carboxamide (MK-8617), an Orally Active Pan-Inhibitor of Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase 1-3 (HIF PHD1-3) for the Treatment of Anemia. / J.S. Debenham, C. Madsen-Duggan, M.J. Clements [et al.] // *J Med Chem.* – 2016. – Vol.59, No 24. – P. 11039-11049.
64. Delgado-Ramirez, Y. Signal transducer and activator of transcription 6 as a target in colon cancer therapy. / Y. Delgado-Ramirez, V. Colly, G.V. Gonzalez [et al.] // *Oncol Lett.* – 2020. – Vol.20, No 1. – P. 455-464.
65. DeNardo, D.G. CD4 (+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. / D.G. DeNardo, J.B. Barreto, P. Andreu [et al.] // *Cancer Cell.* – 2009. – Vol.16, No 2. – P. 91-102.
66. DeNardo, D.G. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. / D.G. DeNardo, L.M. Coussens // *Breast Cancer Res.* – 2007. – Vol.9, No 212.
67. Deshmukh, S. An efficient synthesis of pyrazolo[1,5-a] pyrimidines and evaluation of their antimicrobial activity / S. Deshmukh, K. Dingore, V. Gaikwad [et al.] // *J. Chem. Sci.* – 2016. – Vol.128, No 9. – P. 1459-1468.
68. Dicato, M. Anemia in cancer / M. Dicato, L. Plawny, M. Diedrich // *Annals of oncology.* – 2010 – Vol.7. – P.167-172

69. Dinding, Q. Chronic inflammation confers to the metabolic reprogramming associated with tumorigenesis of colorectal cancer. / Q. Dingding, S. Liangliang, L. Shaoqing [et al.] // *Cancer Biol. Ther.* – 2017. – Vol.18. – P. 237–244.
70. Du, J.W. Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer. / J.W. Du, K.Y. Xu, L.Y. Fang [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2012. – Vol.6, No 5. – P. 1099-1102
71. Feichtenschlager, V. Suppression of NRAS-mutant melanoma growth with NRAS-targeting Antisense Oligonucleotide treatment reveals therapeutically relevant kinase co-dependencies. / V. Feichtenschlager, Y.J. Zheng, T. Qu [et al.] // *Commun Med.* – 2025. – Vol.5, No 216.
72. Feng, L. Serum levels of il-6, il-8, and il-10 are indicators of prognosis in pancreatic cancer. / L. Feng, Q. Qi, P. Wang // *J Int Med Res.* – 2018. – Vol.46, No 12. – P. 5228–36.
73. Fernandes, Q. Chronic inflammation and cancer: the two sides of a coin. / Q. Fernandes, V.P. Inchakalody, T. Bedhiafi [et al.] // *Life Sci.* – 2024. – Vol.338, No 1. – P. 122390.
74. Formica, V. Immune reaction and colorectal cancer: Friends or foes? / V. Formica, V. Cereda, A. Nardecchia [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – Vol.20. – P. 12407–12419.
75. Frey, R.R. 7-Aminopyrazolo[1,5-a]pyrimidines as potent multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitors. / R.R. Frey, M.L. Curtin, D.H. Albert [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2008. – Vol.51, No 13. – P. 3777-3787.
76. Galmarini, C.M. Oral ftorafur plus intramuscular thiotepa as adjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. / C.M. Galmarini, C. Garbovesky, D. Galmarini [et al.] // *Med Oncol.* – 2002. – Vol.19, No 4. – P. 227–232.
77. Galon, J. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. / J. Galon, A. Costes, F. Sanchez-Cabo [et al.] // *Science.* – 2006. – Vol.313. – P. 1960–1964.
78. Glynn, S.A. COX-2 activation is associated with Akt phosphorylation and poor survival in ER-negative, HER2-positive breast cancer. / A. Sharon, R. L. Prueitt, L.A. Ridnour [et al.] // *BMC Cancer.* – 2010. – Vol.10, No 626.

79. Goldberg, J. The immunology of hormone receptor positive breast cancer. / J. Goldberg, R.G. Pastorello, T. Vallius [et al.] // *Front Immunol.* – 2021. – Vol.12. – P. 674192.
80. Gounni, A.S. Human airway smooth muscle cells express the high affinity receptor for IgE (FcεRI): A critical role of FcεRI in human airway smooth muscle cell function. / A.S. Gounni, V. Wellemans, J. Yang [et al.] // *J. Immunol.* – 2005. – Vol.175. – P. 2613–2621
81. Grivennikov, S.I. Immunity, inflammation, and cancer. / S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin // *Cell.* – 2010. – Vol.140. – P. 883–899
82. Guangchuan, X. Adjuvant chemotherapy following radical surgery for nonsmall-cell lung cancer: a randomized study on 70 patients. / X. Guangchuan, R. Tiehua, L. Peng [et al.] // *Chinese Medical Journal.* – 2000 – Vol.113, No 7. – P. 617–20
83. Guenova, E. TH2 Cytokines From Malignant Cells Suppress TH1 Responses and Enforce a Global TH2 Bias in Leukemic Cutaneous T-Cell Lymphoma. / E. Guenova, R. Watanabe, J.E. Teague // *Clin Cancer Res.* – 2013. – Vol.19, No 14. – P. 3755–3763.
84. Halim, L. An Atlas of Human Regulatory T Helper-like Cells Reveals Features of Th2-like Tregs that Support a Tumorigenic Environment. / L. Halim, M. Romano, R. McGregor [et al.] // *Cell Rep.* – 2017. – Vol.20, No 3. – P. 757-770.
85. Hamilton, D. Macroimmunology and Immunotherapy of Cancer. / D. Hamilton, N. Ismail, D. Kroeger [et al.] // *Immunotherapy.* – 2009. – Vol.1, No 3. – P. 367–383.
86. Hamilton, D.H. Different Immune Correlates Associated With Tumor Progression and Regression: Implications for Prevention and Treatment of Cancer. / D.H. Hamilton, P.A. Bretscher. // *Cancer Immunol Immunother.* – 2008. – Vol.57, No 8. – P. 1125–1136.
87. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: The next generation. / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol.144. – P. 646–674.
88. Harris, R.E. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. / R.E. Harris, G.A. Alshafie, H. Abou-Issa // *Cancer Res.* – 2000. – Vol.60. – P. 2101–2103
89. Hassan, A.S. Synthesis and biological evaluation of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide as antimicrobial agents. / A.S. Hassan, D.M. Masoud, F.M. Sroor [et al.] // *Med Chem Res.* – 2017. – Vol.26, No 11. – P. 2909-2919.
90. Hassan, A.Y. New fused pyrazolopyrimidine derivatives; heterocyclic styling, synthesis, molecular docking and anticancer evaluation. / A.Y. Hassan, N.M. Saleh, M.S. Kadh [et al.] // *J. Heterocyclic Chem.* – 2020. – Vol.57, No 7. – P. 2704-2721.

91. Hawley, S.A. BAY-3827 and SBI-0206965: Potent AMPK Inhibitors That Paradoxically Increase Thr172 Phosphorylation. / S.A. Hawley, F.M. Russell, F.A. Ross [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol.25. – P. 453.
92. Hazini, A. Deregulation of hla-I in cancer and its central importance for immunotherapy. / A. Hazini, K. Fisher, L. Seymour // *J Immunother Cancer.* – 2021 – Vol.9, No 8.
93. Herrero, A. Inhibition of COX-2 Impairs Colon Cancer Liver Metastasis through Reduced Stromal Cell Reaction. / A. Herrero, A. Benedicto, I. Romayor [et al.] // *Biomolecules & Therapeutics.* – 2021. – Vol.29. – P. 342-351
94. Hirose, S. Interleukin-4 induced 1-mediated resistance to an immune checkpoint inhibitor through suppression of CD8+ T cell infiltration in melanoma. / S. Hirose, T. Mashima, X. Yuan [et al.] // *Cancer Sci.* – 2024. – Vol.115, No 3. – P. 791-803.
95. Hou, N. A novel chronic stress induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth. / N. Hou, X. Zhang, L. Zhao [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – Vol.439. – P. 471–476
96. Howe, L.R. Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. / L.R. Howe, K. Subbaramaiah, A.M. Brown [et al.] // *Endocr. Relat. Cancer* – 2001. – Vol.8. – P. 97–114.
97. Huang, B. The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers. / B. Huang, X. Lang, X. Li [et al.] // *Front. Oncol.* – 2022. – Vol.12. – P. 1023177.
98. Im, S-A. Expression of cyclooxygenase-2 in Korean breast cancer patients and the in vitro growth inhibitory effect of celecoxib in breast cancer cells. / J. S.-A. Im, D. Y. Kim, E. Nam [et al.] // *Clin. Oncol.* – 2004. – Vol.22, No 14. – P. 9715.
99. Isaacs, J. Biomarkers of immune checkpoint blockade response in triple-negative breast cancer. / J. Isaacs, C. Anders, H. McArthur // *Curr Treat Options Oncol.* – 2021. – Vol.22, No 5. – P. 38.
100. Ismail, N.S.M. Medicinal attributes of pyrazolo[1,5-a] pyrimidine based scaffold derivatives targeting kinases as anticancer agents. / N.S.M. Ismail, G.M.E. Ali, D.A. Ibrahim, A.M. Elmetwali // *Futur J. Pharm. Sci.* – 2016. – Vol.2, No 2. – P. 60-70.
101. Itakura, E. Il-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. / E. Itakura, R.R. Huang, D.R. Wen [et al.] // *Mod Pathol.* – 2011. – Vol.24, No 6. – P. 801–809.

102. Iwakura, Y. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. /Y. Iwakura, H. Ishigame // *J. Clin. Investig.* – 2006. – Vol.116. – P. 1218–1222
103. Jacquelot, N. Immunophenotyping of stage III melanoma reveals parameters associated with patient prognosis. / N. Jacquelot, M.P. Roberti, D.P. Enot [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology.* – 2016. – Vol.136, No 5. – P. 994–1001
104. Jang, H.J. Synthesis of Thienopyrimidine Derivatives as Inhibitors of STAT3 Activation Induced by IL-6 / H.J. Jang, S.M. Kim, M.C. Rho [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2019. – Vol.29, No 6. – P. 856–862.
105. Jayakumar, A. Stat6 promotes intestinal tumorigenesis in a mouse model of adenomatous polyposis by expansion of MDSCs and inhibition of cytotoxic CD8 response. / A. Jayakumar, A.L.M. Bothwell // *Neoplasia.* – 2017 – Vol.19. – P. 595–605
106. Johnson, D. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. / D. Johnson, R. O'Keefe, J. Grandis J. // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2018. – Vol.15. – P. 234–248
107. Jou, E. An innate IL-25–ILC2–MDSC axis creates a cancer-permissive microenvironment for Apc mutation–driven intestinal tumorigenesis. / E. Jou, N. Rodriguez-Rodriguez, A.F. Ferreira [et al.] // *Sci Immunol.* – 2022. – Vol.7, No 72.
108. Jou, E. Type 1 and type 2 cytokine-mediated immune orchestration in the tumour microenvironment and their therapeutic potential. / E. Jou // *Explor Target Antitumor Ther.* – 2023 – Vol.4, No 3. – P. 474-497.
109. Kim, Y. High levels of baseline serum il-10 are associated with reduced clinical benefit from first-line immune checkpoint inhibitor therapy in advanced renal cell carcinoma. / Kim Y, Yang H, Lee WS [et al.] // *J Cancer.* – 2023 – Vol.14, No 6. – P. 935–942.
110. Knochelmann, H.M. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. / H.M. Knochelmann, C.J. Dwyer, S.R. Bailey [et al.] // *Cell Mol Immunol.* – 2018. – Vol.15, No 5. – P.458-469.
111. Knudson, K.M. Recent advances in IL-13R α 2- directed cancer immunotherapy. / K.M. Knudson, S. Hwang, M.S. McCann [et al.] // *Front Immunol.* – 2022. – Vol.13.
112. Kopp, E.B. Modes of type 2 immune response initiation. / E.B. Kopp, K. Agaryan, I. Licona-Limón // *Immunity.* – 2023 – Vol.56, No 4. – P. 687-694.
113. Kraft, S. New developments in Fc ϵ RI regulation, function and inhibition. /S. Kraft, J-P. Kinet // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol.7. – P. 365–378.

114. Kryczek, I. IL-22+CD4+ T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. / I. Kryczek, Y. Lin, N. Nagarsheth [et al.] // *Immunity*. – 2014 – Vol.40. – P. 772–784
115. Lee, H.M. Inflammatory cytokine: an attractive target for cancer treatment. / H.M. Lee, H.J. Lee, J.E. Chang. // *Biomedicines*. – 2022 – Vol.10, No 9. – P. 2116.
116. Lee, Y-H. Cancer as a Dysfunctional Immune Disorder: Pro-Tumor TH1-like Immune Response and Anti-Tumor TH $\alpha\beta$ Immune Response Based on the Complete Updated Framework of Host Immunological Pathways. / Y-H Lee, K-W Tsai, K-C Lu [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol.10, No 10. – P. 2497.
117. Li, X. The Notch signaling pathway: A potential target for cancer immunotherapy. / X. Li, X. Yan, Y. Wang [et al.] // *J. Hematol. Oncol.* – 2023. – Vol.16, No 45.
118. Li, Z. Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. / Z. Li, J. Jiang, Z. Wang [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol.68. – P. 8687–8694.
119. Licarete, E. Overcoming Intrinsic Doxorubicin Resistance in Melanoma by Anti-Angiogenic and Anti-Metastatic Effects of Liposomal Prednisolone Phosphate on Tumor Microenvironment. / E. Licarete, V.F. Rauca, L. Luput [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol.21, No 8. – P. 2968.
120. Lim, S.C. Role of COX-2, VEGF and cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma. / S.C. Lim // *Oncol. Rep.* – 2013. – Vol.10. – P. 1241–1249
121. Liu, C.H. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. / C. H. Liu, S. H. Chang, K. Narko [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol.276. – P. 18563–18569
122. Liu, X. The AMPK inhibitor compound C is a potent AMPK-independent anti-glioma agent. / X. Liu, R.R. Chhipa, I. Nakano [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2014. – Vol.13, No 3. – P. 596-605.
123. Locker, G.J. Unexpected severe myelotoxicity of gemcitabine in pretreated breast cancer patients / G.J. Locker, C. Wenzel, M. Schmidinger [et al.] // *Anticancer drugs*. – 2001. – Vol.12, No 3. – P.209-212
124. Lundgren, C. Tumour-infiltrating lymphocytes as a prognostic and tamoxifen predictive marker in premenopausal breast cancer: data from a randomised trial with long-term

follow-up. / C. Lundgren, P.O. Bendahl, M. Ekholm [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2020. – Vol.22, No 1. – P. 140

125. Madeddu, C. Pathogenesis and Treatment Options of Cancer Related Anemia: Perspective for a Targeted Mechanism-Based Approach. / C. Madeddu, G. Gramignano, G. Astara [et al.] // *Front. Physiol.* – 2018. – Vol.9, No 1294.

126. Maibach, F. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Prognostic Value in Cutaneous Melanoma. / F. Maibach, H. Sadozai, S.M. Seyed Jafari [et al.] // *Front Immunol.* – 2020. – Vol.11. – P. 2105.

127. Mahapatra, A. Pyrimidine: a review on anticancer activity with key emphasis on SAR. / A. Mahapatra, T. Prasad, T. Sharma // *Futur J. Pharm. Sci.* – 2021. – Vol.7, No 1.

128. Mak, W.Y. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. J. / W.Y. Mak, M. Zhao S.C. Ng [et al.] // *Gastroenterol. Hepatol.* – 2020. – Vol.35. – P. 380–389.

129. Manchinu, M.F. Deficiency in interferon type 1 receptor improves definitive erythropoiesis in Klf1 null mice. / M.F. Manchinu, C. Brancia, C.A. Caria [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2018. – Vol.25. – P. 589–599.

130. Mantovani, A. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. / A. Mantovani, F. Marchesi, A. Malesci, [et al.] // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol.14. – P. 399–416

131. Marangoni, F. Expansion of tumor-associated Treg cells upon disruption of a CTLA-4-dependent feedback loop. / F. Marangoni, A. Zhakyp, M. Corsini [et al.] // *Cell.* – 2021. – Vol.184. – P. 3998–4015

132. Marone, G. The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma. / G. Marone, F. Granata, V. Pucino // *Front Pharmacol.* – 2019. – Vol.10. – P. 1387

133. Markosyan, N. Mammary carcinoma cell derived cyclooxygenase 2 suppresses tumor immune surveillance by enhancing intratumoral immune checkpoint activity. / N. Markosyan, C.P. Edward, A.E. Rebecca [et al.] // *Breast Cancer Res.* – 2013. – Vol.15, No 5. – R75

134. Mayer, S. The tumor microenvironment shows a hierarchy of cell-cell interactions dominated by fibroblasts. / S. Mayer, T. Milo, A. Isaacson [et al.] // *Nat Commun.* – 2023. – Vol.14. – P. 5810.

135. McClellan, J.L. Exercise effects on polyp burden and immune markers in the ApcMin/+ mouse model of intestinal tumorigenesis. / J.L. McClellan, J.L. Steiner, S.D. Day [et al.] // *Int J Oncol.* – 2014. – Vol.45. – P. 861–868.

136. McCormick, D.L. Inhibition of mammary carcinogenesis by flurbiprofen, a non-steroidal anti-inflammatory agent. / D.L. McCormick, R.C. Moon // *Br. J. Cancer* – 1983. – Vol.48. – P. 859–861

137. Mook, O.R. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. / O.R. Mook, W.M. Frederiks, C.J. Van Noorden // *Biochim Biophys Acta V.* – 2004. – Vol.1705. – P. 69-89

138. Murakami, T. Topical suplatast tosilate (IPD) ameliorates Th2 cytokine-mediated dermatitis in caspase-1 transgenic mice by downregulating interleukin-4 and interleukin-5. / T. Murakami, K. Yamanaka, K. Tokime // *Br J Dermatol.* – 2006. – Vol.155, No 1. – P. 27–32.

139. Najm, M.A.A. An Insight into Pyrazolo scaffold as anticancer./ M.A.A. Oudah, K.H. Najm, W.N.M. Hassan, A.B. Roomi // *Systematic Reviews in Pharmacy.* – 2020. – Vol.11, No 11. – P. 254-263;

140. Nakatsugi, S. Chemoprevention by nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5b]pyridine (PhIP)-induced mammary gland carcinogenesis in rats. / N. Seiichi, O. Toshihisa, K. Toshihiko [et al.] // *Jpn. J. Cancer Res.* – 2005. – Vol.91. – P. 886–892

141. Nakanishi, Y. COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in Apc Min/+ mouse polyps. / Y. Nakanishi, M. Nakatsuji, H. Seno [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2011. – Vol.32. – P.1333–1339.

142. Nappo, G. The immunosuppressive cytokine interleukin-4 increases the clonogenic potential of prostate stem-like cells by activation of STAT6 signalling. / G. Nappo, F. Handle, F.R. Santer [et al.] // *Oncogenesis.* – 2017. – Vol.6.

143. Narayanan, S. Tumor Infiltrating Lymphocytes and Macrophages Improve Survival in Microsatellite Unstable Colorectal Cancer. / S. Narayanan, T. Kawaguchi, X. Peng [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – Vol.9, No 1. – P. 13455

144. National Cancer Institute Melanoma of the Skin-Cancer Stat Facts. [электронный ресурс] – Режим

доступа: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html> Дата обращения: 15.08.2025

145. Nevala, W.K. Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer Center. Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. / W.K. Nevala, C.M. Vachon, A.A. Leontovich // *Clin Cancer Res.* – 2009. – Vol.15, No 6. – P. 1931-1939.

146. Noguchi, M. Effects of the prostaglandin synthetase inhibitor indomethacin on tumorigenesis, tumor proliferation, cell kinetics, and receptor contents of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinoma in Sprague-Dawley rats fed a high or low-fat diet. / M. Noguchi, T. Taniya, N. Koyasaki [et al.] // *Cancer Res.* – 1991. – Vol.51. – P. 2683–2689

147. Noy, J.W. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. / J.W. Noy, J.W. Pollard. // *Immunity Review.* – 2014. – Vol.41. – P. 49-61

148. Oda, N. Effect of suplatast tosilate (IPD-1151T) on cytokine production by allergen-specific human Th1 and Th2 cell lines. / N. Oda, K. Minoguchi, T. Yokoe [et al.] // *Life Sci.* – 1999. – Vol.65, No 8. – P. 763–770.

149. Ogulur, I. Type 2 immunity in allergic diseases. / I. Ogulur, Y. Mitamura, D. Yazici // *Cell Mol Immunol.* – 2025. – Vol.22. – P. 211–242.

150. Oliphant, C.J. MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. / C.J. Oliphant, Y.Y. Hwang, J.A. Walker [et al.] // *Immunity.* – 2014. – Vol.41. – P. 283–295

151. Oliveira, G. Landscape of helper and regulatory antitumour CD4+ T cells in melanoma. / G. Oliveira, K. Stromhaug, N. Cieri [et al.] // *Nature.* – 2022. – Vol.605, No 7910. – P. 532-538.

152. Osawa, E. Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. / E. Osawa, A. Nakajima, T. Fujisawa [et al.] // *Int J Cancer.* – 2006. – Vol.118. – P. 2232–2236

153. Pagès, F. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. / F. Pagès, A. Kirilovsky, B. Mlecnik [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2009. – Vol.27. – P. 5944–5951.

154. Pan, C. Next-generation immuno-oncology agents: current momentum shifts in cancer immunotherapy / C. Pan, H. Liu, E. Robins [et al.] // *Journal of Hematology and Oncology.* – 2020. – Vol.13, No 29.

155. Pastuszak-Lewandoska, D. The Expression Levels of IL-4/IL-13/STAT6 Signaling Pathway Genes and SOCS3 Could Help to Differentiate the Histopathological Subtypes of Non-Small Cell Lung Carcinoma. / D. Pastuszak-Lewandoska, D. Domańska-Senderowska, A. Antczak [et al.] // *Mol Diagn Ther.* – 2018. – Vol.22. – P. 621–629.
156. Pelaia, C. Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. / C. Pelaia, G. Paoletti, F. Puggioni // *Front Physiol.* – 2019. – Vol.10. – P. 1514
157. Petitprez, F. The tumor microenvironment in the response to immune checkpoint blockade therapies. / F. Petitprez, M. Meylan, A. de Reyniès [et al.] // *Front Immunol.* – 2020. – Vol.11, No 7. – P. 784
158. Petrova, V. Immunosuppressive capacity of circulating MDSC predicts response to immune checkpoint inhibitors in melanoma patients. / V. Petrova, C. Groth, R. Bitsch [et al.] // *Front Immunol.* – 2023. – Vol.14. – P. 1065767.
159. Pires da Silva, I. Distinct Molecular Profiles and Immunotherapy Treatment Outcomes of V600E and V600K BRAF-Mutant Melanoma. / I. Pires da Silva, K.Y.X. Wang, J.S. Wilmott [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2019. – Vol.25, No 4. – P. 1272-1279.
160. Qiang, L. Ginsenoside Rh1 attenuates ovalbumin-induced asthma by regulating Th1/Th2 cytokines balance. / L. Qiang, Z. Chunmiao, W. Guodong [et al.] // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* – 2021. – Vol.85, No 8. – P. 1809–1817.
161. Qiao, J. Targeting tumors with il-10 prevents dendritic cell-mediated Cd8 (+) T cell apoptosis. / J. Qiao, Z. Liu, C. Dong [et al.] // *Cancer Cell.* – 2019. – Vol.35, No 6. – P. 901–915
162. Qihang, S. Polysaccharides regulate Th1/Th2 balance: A new strategy for tumor immunotherapy, / S. Qihang, Y. Xiaoyun, S. Qi [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2024. – Vol.170. – P. 115976
163. Qi, J. Single-cell transcriptomic landscape reveals tumor specific innate lymphoid cells associated with colorectal cancer progression. / J. Qi, A. Crinier, B. Escaliere [et al.] // *Cell Reports Medicine.* – 2021. – Vol.2, No 8.
164. Roerden, M. Cancer immune evasion, immunoediting and intratumour heterogeneity. / M. Roerden, S. Spranger // *Nat Rev Immunol.* – 2025. – Vol.25. – P. 353–369
165. Ruiz-Saenz, A. A reversible SRC-relayed COX2 inflammatory program drives resistance to BRAF and EGFR inhibition in BRAFV600E colorectal tumors. / A. Ruiz-Saenz, C.E. Atreya, C. Wang [et al.] // *Nat Cancer.* – 2023. – Vol.4, No 2. – P. 240-256.

166. Ruffell, B. Leukocyte composition of human breast cancer. / B. Ruffell, A. Au, H.S. Rugo // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2012. – Vol.109. – P. 2796–2801.
167. Saginala, K. Epidemiology of Melanoma. / K. Saginala, A. Barsouk, J.S. Aluru // *Med Sci (Basel)*. – 2021. – Vol.9, No 4. – P. 63.
168. Schiavoni, G. Editorial: Emerging Roles for Type 2-Associated Cells and Cytokines in Cancer Immunity. / G. Schiavoni, A. Munitz, J. Strid // *Front. Immunol.* – 2021 – Vol.12. – P. 811125.
169. Schuijs, M.J. ILC2-driven innate immune checkpoint mechanism antagonizes NK cell antimetastatic function in the lung. / M.J. Schuijs, S. Png, A.C. Richard [et al.] // *Nat Immunol.* – 2020. – Vol.21. – P. 998–1009
170. Shaochuan, L. Novel strategies for cancer immunotherapy: counter immunoediting therapy / L. Shaochuan, S. Qian, R. Xiubao // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2023. – Vol.16, No 38.
171. Shamoun, L. Association study on IL-4, IL-4Ralpha and IL-13 genetic polymorphisms in Swedish patients with colorectal cancer. / L. Shamoun, M. Skarstedt, R. Andersson [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2018. – Vol.487. – P. 101–106
172. Shen, Y. A tumor-specific Th2 clone initiating tumor rejection via primed CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activation in mice. / Y. Shen, S. Fujimoto. // *Cancer Res.* – 1996 – Vol.56, No 21. – P. 5005–5011
173. Sheng, J. The Role of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer. / J. Sheng, H. Sun, F.B. Yu // *Int J Med Sci.* – 2020. – Vol.17, No 8. – P. 1095-1101.
174. Shi, J. Involvement of IL-4, IL-13 and their receptors in pancreatic cancer. / J. Shi, X. Song, B. Traub // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol.22. – P. 2998.
175. Singh, B. COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. / B. Singh, J.A. Berry, A. Shoher // *Oncogene.* – 2007. – Vol.26, No 26. – P. 3789–3796
176. Singh, N. Inflammation and cancer. / N. Singh, D. Baby, J.P. Rajguru [et al.] // *Ann Afr Med.* –2019 – Vol.18. – P. 121–126
177. Song, X. Possible Roles of Interleukin-4 and -13 and Their Receptors in Gastric and Colon Cancer. / X. Song, B. Traub, J. Shi J [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol.22, No 2. – P. 727.

178. Sung, H. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. / H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel [et al.] // *CA Cancer J Clin.* – 2021. – Vol.71, No 3. – P. 209-249
179. Suzuki, A. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. / A. Suzuki, P. Leland, B.H. Joshi [et al.] // *Cytokine.* – 2015. – Vol.75. – P. 79–88
180. Takatsu, K. IL-5 and eosinophilia. / K. Takatsu, H. Nakajima // *Curr Opin Immunol.* – 2008. – Vol.20. – P. 288–294.
181. Taniguchi, K. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. / K. Taniguchi, M. Karin // *Semin Immunol.* – 2014. – Vol.26, No 1. – P. 54-74.
182. Tanyong, D.I. Effect of Tumor Necrosis Factor-Alpha on Erythropoietin and Erythropoietin Receptor-Induced Erythroid Progenitor Cell Proliferation in β -Thalassemia/Hemoglobin E Patients. / D.I. Tanyong, P. Panichob, W. Kheansaard [et al.] // *Turk J Haematol.* – 2015. – Vol.32, No 4. – P. 304-310.
183. Tian, J. Understanding the Tumor Microenvironment in Melanoma Patients with In-Transit Metastases and Its Impacts on Immune Checkpoint Immunotherapy Responses. /J. Tian, C. Quek // *Int J Mol Sci.* – 2024. – Vol.25, No 8. – P. 4243.
184. Utsunomiya, A. Clinical significance of a blood eosinophilia in adult T-cell leukemia/lymphoma: a blood eosinophilia is a significant unfavorable prognostic factor. / A. Utsunomiya, T. Ishida, A. Inagaki [et al.] // *Leuk Res.* – 2007. – Vol.31. – P. 915–920.
185. Vasilyeva, S.V. Novel fluorescent pyrimidine nucleosides containing 2,1,3-benzoxadiazole and naphtho-[1,2,3-CD] Indole-6 (2H)-one fragments. / S.V. Vasilyeva, A.S. Kuznetsova, J.G. Khalyavina // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2014. – Vol.33, No 9. – P. 615-25.
186. van den Bulk, J. Neoantigen Targetability in Progressive Advanced Melanoma. /J. van den Bulk, E.M.E. Verdegaal, M. van der Ploeg [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2023. – Vol.29, No 20. – P. 4278-4288.
187. Van Dyken, S.J. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. / S.J. Van Dyken, R.M. Locksley // *Annu Rev Immunol.* – 2013. – Vol.31. – P. 317-43.

188. von Moltke, J. Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. / J. von Moltke, M. Ji, H-E. Liang [et al.] // *Nature*. – 2016. – Vol.529. – P. 221–225.
189. Wang, D. Cyclooxygenases and prostaglandins in tumor immunology and microenvironment of gastrointestinal cancer. / D. Wang, C.S. Cabalag, N.J. Clemons // *Gastroenterology*. – 2021. – Vol.161. – P. 1813–1829.
190. Wang, D. Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice. / D. Wang, L. Fu, H. Sun [et al.] // *Gastroenterology*. – 2015. – Vol.149, No 7. – P. 1884-1895
191. Wang, H. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4. Priming for protumoral functions / H. Wang, J. Joyce // *Cell Cycle*. – 2010. – Vol.9, No 24. – P. 4824-4835.
192. Wang, L. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. / L. Wang, T. Yi, M. Kortylewski [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2009. – Vol.206. – P. 1457–1464.
193. Wang, R. Increased il-10 mrna expression in tumor-associated macrophage correlated with late stage of lung cancer. / R. Wang, M. Lu, J. Zhang [et al.] // *J Exp Clin Cancer Res*. – 2011. – Vol.30, No 1. – P. 62.
194. Wang, S. Transdifferentiation of tumor infiltrating innate lymphoid cells during progression of colorectal cancer. / S. Wang, Y. Qu, P. Xia [et al.] // *Cell Res*. – 2020. – Vol.30. – P. 610-622
195. Wei, J. The COX-2-PGE2 Pathway Promotes Tumor Evasion in Colorectal Adenomas. / J. Wei, J. Zhang, D. Wang [et al.] // *Cancer Prev Res (Phila)*. – 2022. – Vol.15, No 5. – P. 285-296.
196. Wennerberg, E. CD73 Blockade Promotes Dendritic Cell Infiltration of Irradiated Tumors and Tumor Rejection. / E. Wennerberg, S. Spada, N.P. Rudqvist // *Cancer Immunol Res*. – 2020. – Vol.8, No 4. – P. 465–478
197. Xiao, Y. Identification of the prognostic value of Th1/Th2 ratio and a novel prognostic signature in basal-like breast cancer. / Y. Xiao, Y. Huang, J. Jiang. [et al.] // *Hereditas*. – 2023 – Vol.160, No 2.

198. Xu, G. Associations of polymorphisms in interleukins with susceptibility to breast cancer: evidence from a meta-analysis. / G. Xu, F. Wang // *Cytokine*. – 2020. – Vol.130. – P. 154988.
199. Yang, X.Z. The application of bioactive pyrazolopyrimidine unit for the construction of fluorescent biomarkers. / X.Z. Yang, R. Sun, X. Guo [et al.] // *Dyes and Pigments*. – 2020. – Vol.173. – P. 107878.
200. Yoshinaka, R. COX-2 inhibitor celecoxib suppresses tumor growth and lung metastasis of a murine mammary cancer. / R. Yoshinaka, M. Shibata, J. Morimoto // *Anticancer Res*. – 2006. – Vol.26, No 6B. – P. 4245–4254.
201. Zaynagetdinov, R. Interleukin-5 facilitates lung metastasis by modulating the immune microenvironment. / R. Zaynagetdinov, T.P. Sherrill, L.A. Gleaves [et al.] // *Cancer Res*. – 2015. – Vol.75. – P. 1624–1634.
202. Zhao, H. Enhancing doxorubicin's anticancer impact in colorectal cancer by targeting the Akt/Gsk3 β /mTOR-SREBP1 signaling axis with an HDAC inhibitor. / H. Zhao, Y Wu, S.M. Kim // *Korean J Physiol Pharmacol*. – 2025. – Vol.29, No 3. – P. 321-335.
203. Zhao, M. Design and synthesis of novel pyrazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives bearing nitrogen mustard moiety and evaluation of their antitumor activity in vitro and in vivo / M. Zhao, H. Ren, J. Chang [et al.] // *J. Med. Chem*. – 2016. – Vol.26. – P. 2708.
204. Zhao, S.T. Regulatory T cells and asthma. / S.T. Zhao, C.Z. Wang. // *J Zhejiang Univ Sci B*. – 2018. – Vol.19, No 9. – P. 663–673
205. Zhou, C.B. The role of pyroptosis in gastrointestinal cancer and immune responses to intestinal microbial infection. / C.B. Zhou, J.Y. Fang // *Rev. Cancer*. – 2019. – Vol.1872, No 1. – P. 1-10.
206. Zhu, R. The role of tumor-associated macrophages in lung cancer. / R. Zhu, J. Huang, F. Qian // *Front Immunol*. – 2025. – Vol.16. – P. 1556209.
207. Zou, S. Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy / S. Zou, B. Liu, W. Huang // *Molecular Cancer*. – 2020. – Vol.19, No 145.