

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки федерального
исследовательского центра проблем химической физики и медицинской
химии Российской академии наук (ФИЦ ПХФ и МХ РАН)
Институт физиологически активных веществ Федерального
государственного бюджетного учреждения науки федерального
исследовательского центра проблем химической физики и медицинской
химии Российской академии наук (ИФАВ РАН)

На правах рукописи

АЛЕКСАНДРОВА ЮЛИЯ РОМАНОВНА

**ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ ГИДРОКСАМОВЫХ КИСЛОТ КАК
КЛЮЧЕВОЙ ФАКТОР ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ АГЕНТОВ**

1.5.4. Биохимия (биологические науки)

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
М.Е. Неганова

Уфа – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Особенности структуры гидроксамовых кислот.....	14
1.2. Перспективные направления химической модификации гидроксамовых кислот.....	19
1.3. Окислительный стресс в развитии и прогрессировании нейродегенеративных и онкологических патологий.....	24
1.4. Роль гидроксамовых кислот в модуляции окислительного стресса при нейродегенерации и злокачественных новообразованиях.....	25
1.5. Значение митохондриальной дисфункции и перепрограммирования метаболического состояния при нейродегенерации и онкопатологии.....	32
1.6. Влияние гидроксамовых кислот на функционирование митохондрий и метаболизм клеток при нейропатологии и онкологических заболеваниях.....	34
1.7. Роль модификаций гистонов в регуляции экспрессии генов, патогенетически значимых для развития нейродегенеративных и онкологических заболеваний.....	40
1.7.1. Гистоны: структура, функции, посттрансляционные модификации.....	40
1.7.2. Деацетилирование гистонов, HDACs.....	42
1.8. Гидроксамовые кислоты как ингибиторы HDAC	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	52
2.1. <i>In vitro</i> методы исследования.....	52
2.1.1. Животные.....	52
2.1.2. Приготовление гомогената мозга крыс.....	52
2.1.3. Получение митохондрий печени крыс.....	52

2.1.4.	Количественное определение белка.....	53
2.1.5.	Определение интенсивности перекисного окисления липидов.....	54
2.1.6.	Анализ антирадикальной активности.....	55
2.1.7.	Изучение Fe(II)-хелатирующей способности.....	56
2.1.8.	Определение активности гистоновых деацетилаз.....	56
2.1.9.	Исследование действия на трансмембранный потенциал митохондрий.....	57
2.1.10	Анализ влияния на гликолитический профиль опухолевых клеток.....	58
2.1.11	Исследование антиагрегационной активности в отношении β -амилоидного пептида.....	60
2.1.12	Клеточные линии и их культивирование.....	60
2.1.13	Определение выживаемости клеток с помощью МТТ-теста.....	61
2.2.	<i>In vivo</i> методы исследования.....	62
2.2.1.	Животные для исследования противоопухолевого потенциала.....	62
2.2.2.	Исследование острой токсичности.....	63
2.2.3.	Анализ хемосенсибилизирующих свойств.....	63
2.2.4.	Животные и экспериментальные группы при исследовании нейропротекторного потенциала.....	64
2.2.5.	Исследование общего поведения в тесте Открытое поле.	65
2.2.6.	Изучение эпизодической памяти в тесте Распознавание нового объекта.....	66
2.2.7.	Анализ пространственной памяти в тесте Водный лабиринт Морриса.....	67
2.3.	<i>Ex vivo</i> методы исследования.....	70
2.3.1.	Получение и анализ образцов внутренних органов.....	70
2.3.2.	Процедура извлечения образцов головного мозга.....	70

2.3.3.	Определение содержания малонового диальдегида.....	70
2.3.4.	Определение содержания глутатиона.....	71
2.3.5.	Оценка биоэнергетических параметров митохондриальной р2 фракции.....	71
2.3.6.	Гистология и гистохимия.....	72
2.4.	Статистическая обработка данных.....	73
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....		74
3.1.	Хемотипы исследуемых гидроксамовых кислот.....	74
3.1.1.	Спироциклические гидроксамовые кислоты, содержащие аминокислоты.....	74
3.1.2.	Спироциклические гидроксамовые кислоты на основе хиназолина.....	75
3.1.3.	Гидроксамовые кислоты линейной структуры, содержащие фрагменты адамантана и природных соединений.....	76
3.2.	Биологическая активность гидроксамовых кислот.....	77
3.2.1.	Хемосенсибилизирующая активность спироциклических гидроксамовых кислот, содержащих аминокислоты.....	77
3.2.1.1.	<i>In vitro</i> исследование мишеней действия гидроксамовых кислот.....	77
3.2.1.2.	<i>In vivo</i> исследование хемосенсибилизирующей активности гидроксамовых кислот.....	82
3.2.2.	Противоопухолевый потенциал спироциклических гидроксамовых кислот на основе хиназолина.....	85
3.2.2.1.	Влияние гидроксамовых кислот на выживаемость клеток.....	85
3.2.2.2.	Способность гидроксамовых кислот модулировать процессы, связанные с окислительным стрессом.....	87

3.2.2.3.	Влияние гидроксамовых кислот на трансмембранный потенциал митохондрий.....	90
3.2.2.4.	Ингибирование ферментативной активности HDAC1 гидроксамовыми кислотами.....	92
3.2.2.5.	Модуляция гидроксамовыми кислотами гликолитических функций опухолевых клеток..	93
3.2.3.	Нейропротекторные свойства гидроксамовых кислот, содержащих фрагменты адамантана и природных соединений.....	95
3.2.3.1.	<i>In vitro</i> исследование нейропротекторного потенциала гидроксамовых кислот.....	96
3.2.3.2.	<i>In vivo</i> исследование нейропротекторного потенциала гидроксамовых кислот.....	103
3.2.3.3.	<i>Ex vivo</i> исследование нейропротекторного потенциала гидроксамовых кислот	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		116
ВЫВОДЫ.....		119
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....		120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Одной из стратегически важных задач здравоохранения является улучшение качества жизни населения и вывод на рынок новых лекарственных средств, востребованных для терапии социально-значимых патологий, в первую очередь, онкологических и нейродегенеративных заболеваний. По оценкам Всемирной организации здравоохранения к 2030 году в мире от онкозаболеваний будут ежегодно умирать 15 млн. человек, а количество пациентов с различными формами нейродегенеративных заболеваний достигнет 70 млн. Ввиду того, что методы лечения данных патологий до сих пор остаются ограниченными, приоритетным направлением современной биомедицинской химии является разработка более эффективных подходов с целью получения лекарственных средств нового поколения, оказывающих влияние на несколько ключевых звеньев патогенеза заболеваний.

Гидроксамовые кислоты известны как один из перспективных классов химических соединений, обладающих широким спектром биологической активности (Mottamal et al., 2015). В качестве биомишеней, на которые могут воздействовать такие соединения, рассматриваются в первую очередь металлоферменты класса гистоновых деацетилаз как основные звенья эпигенетической регуляции (Qin et al., 2017), а также компоненты редокс-системы, участвующие в процессах, связанных с окислительным стрессом, и митохондрии. В связи с этим поиск в ряду гидроксамовых кислот потенциальных лекарственных средств с запрограммированными свойствами по отношению к специфическим терапевтическим мишеням и процессам, лежащим в основе патогенеза онкологических и нейродегенеративных заболеваний человека, является актуальным и перспективным направлением

на стыке фундаментальных наук и здравоохранения, которое характеризуется высокой значимостью.

Степень разработанности темы исследования

Уже более трёх десятков лет гидроксамовые кислоты являются одним из перспективных классов химических соединений с доказанным противоопухолевым потенциалом. На сегодняшний день Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов одобрено использование трёх представителей данного класса для лечения кожной и периферической Т-клеточной лимфомы и множественной миеломы - вориностат, панобиностат и белиностат (Cappellacci et al., 2020), что наглядно подтверждает перспективность поиска антинеопластических агентов среди гидроксамовых кислот. Кроме того, в последние годы показана успешность использования гидроксамовых кислот и в терапии нейродегенеративных заболеваний за счёт способности препятствовать нейрональной гибели и восстанавливать когнитивные функции (Chopra et al., 2016). Однако, несмотря на многочисленные попытки создания терапевтических средств на основе гидроксамовой кислоты, до сих пор отсутствуют высокоэффективные противоопухолевые или нейропротекторные агенты, которые могли бы синергетически сочетать в себе свойства, модулирующие патологические каскады, без потери эффективности в отношении ключевых мишеней действия соединений данного класса - гистоновых деацетилаз.

В связи с этим всестороннее исследование биологической активности ранее не описанных гидроксамовых кислот различных хемотипов является перспективным направлением получения новых многоцелевых потенциальных лекарственных препаратов противоопухолевой или нейропротекторной направленности.

Цель исследования

Поиск потенциальных полифункциональных противоопухолевых или нейропротекторных соединений среди гидроксамовых кислот различных хемотипов.

Задачи исследования

1. Провести *in vitro* и *in vivo* исследование хемосенсибилизирующих свойств спироциклических гидроксамовых кислот, содержащих аминокислоты, и определить потенциальный механизм действия.
2. Изучить противоопухолевый потенциал спироциклических гидроксамовых кислот, имеющих в структуре хиназолиновое ядро. Определить механизмы цитотоксического действия - влияние на окислительный стресс, эпигенетическую регуляцию, митохондриальные характеристики и процесс гликолиза.
3. Исследовать *in vitro* и *in vivo* нейропротекторные свойства гидроксамовых кислот линейной структуры, содержащих фрагменты адамантана и природных соединений.

Научная новизна

В рамках выполнения диссертационного исследования впервые был проведен комплексный *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* анализ биологической активности ряда ранее не описанных гидроксамовых кислот, включая спироциклические гидроксамовые кислоты, а также соединения с линейной структурой. Были получены данные о возможных механизмах фармакологического действия перспективных субстанций на основе гидроксамовой кислоты на молекулярном и клеточном уровнях, вовлечённых в патогенез онкологических заболеваний и нейродегенеративных патологий.

Теоретическая и практическая значимость.

Помимо получения новых фундаментальных знаний о роли новых ранее не описанных гидроксамовых кислот в терапии онкологических и нейродегенеративных заболеваний диссертационная работа имеет выраженный практический результат. По итогам изучения биологической активности соединений определены вещества с высоким терапевтическим потенциалом. Данные соединения могут быть как основой для дальнейшей химической оптимизации с целью разработки эффективных полифармакофорных препаратов, так и самостоятельными единицами, рекомендованными для дальнейших исследований в доклинических испытаниях и последующего практического использования в фармацевтической отрасли.

Методология и методы исследования

В основу методологического подхода, использованного в данной работе, положены современные методы *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* анализа, включающие комплексное применение биохимических, гистологических, гистохимических, поведенческих и статистических методик, а также анализа описанных в литературе экспериментальных данных ведущих авторов в области биомедицинской химии и фармакологии.

Положения, выносимые на защиту

1. Выявленное в ряду спироциклических гидроксамовых кислот с аминокислотами, соединение, содержащее в структуре валин, обладает хемосенсибилизирующими свойствами на клеточной и животной моделях за счёт ингибирующей активности HDAC1.
2. Спиروциклические гидроксамовые кислоты на основе хиназолина проявляют высокую цитотоксическую активность в отношении клеток

опухолевого происхождения за счет модуляции перекисного окисления липидов, деполяризирующего митохондриальную мембрану действия, снижения ферментативной активности HDAC1 и ингибирования гликолиза.

3. Наиболее перспективная линейная гидроксамовая кислота, содержащая в структуре фрагмент адамантана, проявляет комплексный тип нейропротекторной активности за счёт антиоксидантной способности, ингибирования HDAC6 и препятствия агрегации β -амилоида, а также восстанавливает когнитивные функции мышей 5xFAD, моделирующих болезнь Альцгеймера.
4. Выявлена тенденция спироциклических гидроксамовых кислот проявлять противоопухолевые свойства, а для веществ линейной структуры, содержащих фармакофорные фрагменты адамантана и природных соединений, - оказывать нейропротекторное действие.

Степень достоверности и апробация работы

Объективность и достоверность полученных результатов подтверждены использованием современного научного оборудования, валидированных и актуальных методов, а также корреляцией с литературными данными и высоким рейтингом опубликованных научных работ. Анализ результатов проведен с применением различных приемов статистической обработки и привлечением достаточного числа биологических и аналитических повторностей. Выводы, сформулированные по результатам диссертационной работы, соответствуют поставленным задачам.

Результаты работы представлены на российских и международных научных конференциях, в том числе в виде устных и стендовых докладов на Конгрессе молодых ученых ИТМО (Санкт-Петербург, 2019); 10th Anniversary World Congress on Targeting Mitochondria (Berlin, 2019); European Neuropsychopharmacology (Copenhagen, 2019); Международные научно-

практические фестивали «Молодая наука в классическом университете» (Иваново, 2019-2020); 4 и 5-я Российская конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2019, 2021» (Екатеринбург, Волгоград, 2019, 2021).

Личный вклад автора

Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем к.х.н. Негановой М.Е. Разработка методологических подходов к решению поставленных задач, непосредственное проведение экспериментов по исследованию биологической активности соединений, а также анализ и обсуждение полученных результатов и их оформление в виде научных публикаций и докладов проведены автором лично, либо при непосредственном участии. Подготовка рукописи настоящей диссертационной работы и автореферата лично проводились автором.

Публикации

Основное содержание работы опубликовано в 9 статьях в отечественных и иностранных журналах, среди которых 8 в изданиях, индексируемых Scopus, 7 - Scopus и Web of Science, 1 патенте Российской Федерации и 8 тезисах в сборниках докладов конференций.

Соответствие диссертационной работы паспорту научной специальности

Диссертационная работа «Полифункциональность гидроксамовых кислот как ключевой фактор для создания потенциальных противоопухолевых и нейропротекторных соединений» соответствует паспорту научной специальности 1.5.4. – «Биохимия», охватывающей проблемы выяснения непосредственной взаимосвязи химической структуры

соединений класса гидроксамовых кислот с фармакологической направленностью потенциального терапевтического действия для создания потенциальных лекарственных средств для лечения социально-значимых заболеваний.

Структура и объём работы

Рукопись диссертационной работы написана по классической схеме и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список цитированной литературы, который содержит 223 зарубежных и отечественных источника. Материалы диссертации изложены на 152 страницах машинописного текста, включают 42 рисунка и 8 таблиц

Финансовая поддержка и благодарности

Работа выполнялась в соответствии с планами научно-исследовательских работ Лаборатории биохимии патологических процессов ФИЦ ПХФ и МХ РАН (в.н.с., к.х.н. М.Е. Неганова) с 2019 по 2022 гг. при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-33-01185 мол_а), РНФ (проекты №19-73-10195 и №22-23-00995), а также стипендий Президента и Правительства Российской Федерации на 2022/23 учебный год (приказы Минобрнауки №736 от 8 августа 2022 г. и №750 от 10 августа 2022 г.). Часть результатов диссертационной работы была получена в рамках проекта «Медицинская химия в создании лекарств нового поколения для лечения социально-значимых заболеваний по Соглашению с МНВО РФ № 075-15-2020-777 от «1» октября 2020 г. (договор с ИФАВ РАН №427 от 22.10.2022).

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю в. н. с., к. х. н. М.Е. Негановой за выбор темы исследования, неоценимую помощь, квалифицированные научные консультации и всестороннюю поддержку при выполнении работы. Автор глубоко признателен коллективу

*Лаборатории направленных трансформаций природных соединений №46 НИОХ СО РАН (к. х. н. Е.В. Сулов) за синтез гидроксамовых кислот линейной структуры, с. н. с., к. х. н. В.Н. Осипову (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) и И.В. Выстороп за проведение синтетических работ в рамках получения циклических и спироциклических гидроксамовых кислот, а также с.н.с., к.х.н., руководителю Группы экспериментальной химиотерапии опухолей ФИЦ ПХФ и МХ РАН Д.В. Мищенко за помощь в получении результатов при *in vivo* исследовании хемосенсибилизирующей активности гидроксамовых кислот.*

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В настоящем обзоре рассмотрены данные, описывающие современное состояние исследований фармакологических свойств соединений класса гидроксамовых кислот, оказывающих влияние на перспективные молекулярные мишени действия потенциальных лекарственных средств, обладающих противоопухолевым или нейропротекторным потенциалом (Neganova et al., 2020a, Neganova et al., 2022, 2021b).

1.1. Особенности структуры гидроксамовых кислот

Гидроксамовые кислоты известны с 1869 года, когда Лоссен открыл оксалогидроксамовую кислоту (Lossen, 1869). Однако реальный интерес к изучению их биологической активности исследователи стали проявлять после 1980 года (Gupta and Sharma, 2013). К настоящему времени гидроксамовые кислоты являются одними из наиболее хорошо изученных соединений из-за их значимости во многих аспектах различных патологий. В медицинской химии гидроксамовые кислоты используются при разработке противоопухолевых (Manal et al., 2016), противомаларийных (Giannini et al., 2015), противотуберкулезных (Rao et al., 2018), нейропротекторных средств (Xu et al., 2011), для лечения сердечно-сосудистых (Qiu et al., 2017) и других заболеваний (Qiu et al., 2017).

Гидроксамовые кислоты представлены общей формулой $RCONR'OH$, где R, R' могут быть арильными или замещенными арильными группами. Они относятся к классу органических кислот, которые намного слабее, чем структурно родственные карбоновые кислоты (Marmion et al., 2004). Моногидроксамовая кислота существует в двух таутомерных формах - кето / енол (Gupta, 2015) (рисунок 1 А). Структуры гидроксамовых кислот сходны со структурами гидроксимочевин или карбамилгидроксамовых кислот и имеют ряд общих свойств (рисунок 1 Б).

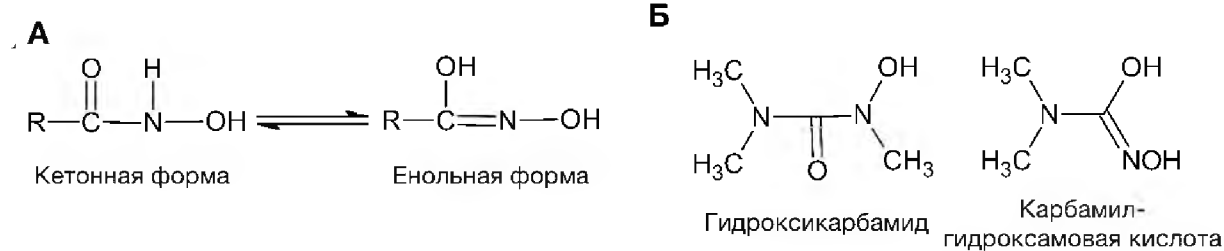


Рисунок 1 – А - Две таутомерные (кето/енольные) формы моногидроксамовой кислоты. Б - Структуры гидроксимочевины и карбамилгидроксамовых кислот.

Из-за упомянутых выше структурных свойств гидроксамовые кислоты обладают сильными хелатирующими и образующими Н-связь свойствами, что в основном обуславливает ряд их биомедицинских применений (Muri et al., 2002, Muri et al., 2004, Scolnick et al., 1997).

Одна из первых документированных физиологических ролей этих соединений была связана с их использованием в качестве сидерофоров. Сидерофоры представляют собой высокоаффинные хелатирующие железо соединения, которые секретируются микроорганизмами, и служат главным образом для переноса железа через клеточные мембраны. В настоящее время сидерофоры широко используются и в медицинской практике. Наиболее известным соединением является десферриоксамин В - линейный сидерофор тригидроксамовой кислоты. Десферриоксамин В эффективно используется как терапия первой линии для лечения β-талассемии начиная с 1960 года (Olivieri and Brittenham, 1997) и около 30 лет был единственной терапией, доступной пациентам с вторичной болезнью перегрузки железом (Borgna-Pignatti et al., 2004). На его основе синтезировано, в том числе биосинтетическим путем, большое количество аналогов. Все аналоги сохраняют функцию хелаторов Fe (III) и обладают свойствами, которые могут расширить полезность десферриоксамина В (Telfer et al., 2019).

Однако основное медицинского применение гидроксамовых кислот связано с тем фактом, что они являются сильными и селективными

ингибиторами большого количества ферментов (Gupta and Sharma, 2013), таких как матриксные металлопротеиназы (Botos et al., 1996, Sani et al., 2004, Steward and Thomas, 2000), пероксидазы (Tsukamoto et al., 1999), гидролазы (Brown et al., 2004)], липоксигеназы (Muri et al., 2002), циклооксигеназы (Connolly et al., 1999, Dooley et al., 2003), гистоновые деацетилазы (Qin et al., 2017), пептидные деформилазы (Chen et al., 2004) и другие.

Наиболее известна и хорошо изучена роль гидроксамовых кислот в качестве ингибиторов гистоновых деацетилаз (Qin et al., 2017). Гидроксаматная группа на сегодняшний день является наиболее распространенной функциональной группой, связывающей цинк, в ингибиторах HDAC (HDACi), благодаря ее способности надежно хелатировать ионы цинка активного центра фермента (Bernstein et al., 2000, de Ruijter et al., 2003).

Некоторые ингибиторы HDAC на основе гидроксамовых кислот, такие как вориностат (1), панобиностат (2) и белиностат (3), были одобрены FDA для лечения кожной Т-клеточной лимфомы, Т-клеточной лимфомы, или множественной миеломы (рисунок 2) (Carpellacci et al., 2020).

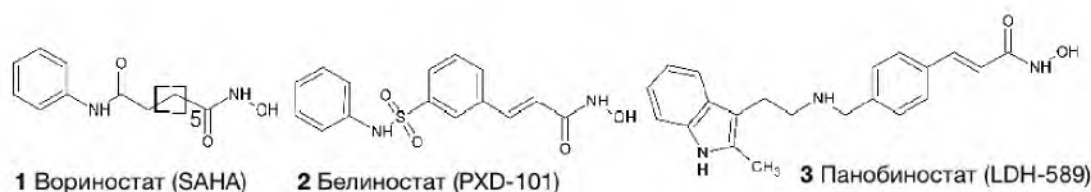


Рисунок 2 – Ингибиторы HDAC, одобренные Агентством Министерства здравоохранения и социальных служб США.

Эти клинические результаты производных гидроксамовой кислоты - ингибиторов HDAC стимулировали деятельность большого количества исследовательских групп в направлении разработки изоформ-селективных соединений или соединений с другим профилем селективности и активности. На сегодняшний день в публикациях и патентах сообщается о большом ряде селективных ингибиторов HDAC на основе гидроксамовой кислоты (Faria

Freitas et al., 2018, Mottamal et al., 2015, Shen and Kozikowski, 2020, Thaler and Mercurio, 2014).

Несмотря на большое структурное разнообразие эти ингибиторы в основном состоят из трех фармакофорных групп: цинк-связывающей группы (zinc binding group - ZBG), линкера и CAP группы (рисунок 3 А) (Huang et al., 2019, Li et al., 2017, Ling et al., 2018, Mehndiratta et al., 2017, Sellmer et al., 2018).

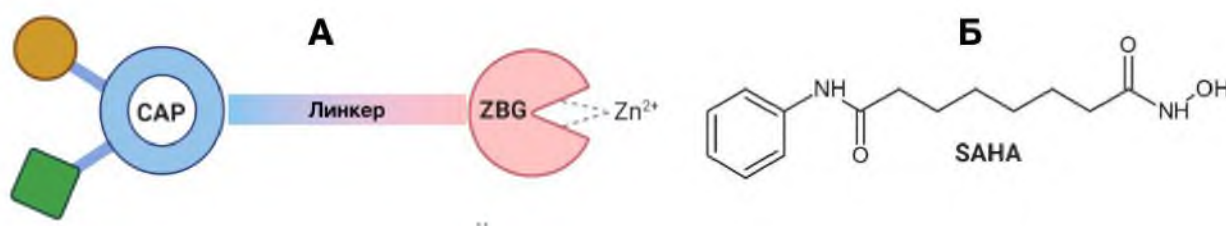


Рисунок 3 – Фармакофоры ингибиторов HDACs на основе гидроксамовых кислот.

ZBG хелатирует Zn^{2+} в нижней части активного центра. CAP группа, рассматриваемая как ключевой фрагмент для распознавания изоформ HDAC, взаимодействует с краем кармана (Zhan et al., 2017). Линкер связывает ZBG с CAP группой и линкер занимает гидрофобный туннель. Наиболее изученным и используемым препаратом является вориностат (субероиланилид гидроксамовой кислоты - SAHA) (рисунок 3 Б). Эффект фенильного заместителя CAP-группы вориностата до конца неясен, однако его низкая селективность в отношении HDACs приводила к побочным эффектам при применении препарата. Было выдвинуто предположение, что изоформ-селективный HDACi может обеспечить более точное регулирование и, таким образом, проявлять уменьшенные побочные эффекты (Su et al., 2008, Witt et al., 2009). Поэтому были проведены многочисленные исследования по улучшению селективности как вориностата, так и в целом ингибиторов HDACs на основе гидроксамовых кислот (Mottamal et al., 2015).

Еще одной быстро развивающейся областью применения гидроксамовых кислот, в том числе ингибиторов HDACs, является использование их в качестве нейропротекторных препаратов. Так, было показано, что 5-арилиндоламзамещенные гидроксамовые кислоты обладают высокой селективной ингибирующей активностью в отношении гистондеацетилазы 6 (HDAC6) со значением IC_{50} 3,92 нМ. Эти соединения не только снижают уровень фосфорилирования тау-белков, но и их агрегацию, проявляют нейропротекторную активность - в моделях на животных улучшают нарушение обучения и памяти и способны преодолевать гематоэнцефалический барьер (Lee et al., 2018). Показано успешное применение гидроксамовых кислот (соединение LBH589) в мышинных моделях хореи Гентингтона (Chopra et al., 2016), в *in vitro* модели болезни Паркинсона, где вориностат защищает дофаминергические нейроны от повреждения, вызванного нейротоксинами (Chen et al., 2012). Низкомолекулярные HDACs ингибиторы показывают эффективность в ряде моделей нейродегенерации *in vivo*: в модели болезни Паркинсона ингибируют токсичность синуклеина в отношении дофаминовых нейронов (Yuan et al., 2014), предотвращают фрагментацию митохондрий и защищают нейроны во время индуцированного MPP⁺ нейронального апоптоза (Zhu et al., 2014). В ряде работ показана взаимозависимость способности гидроксамовых кислот хелатировать ионы металлов, в частности ионы Fe²⁺, антиоксидантной активности и способности ингибировать β -амилоид. Так, гидроксамат сиаловой кислоты является потенциальным поглотителем радикалов и хелатором металла, который ингибирует агрегацию β -амилоида и защищает клетки HeLa и глиобластомы LN229 от окислительного повреждения, вызванного реакцией Фентона, а также клетки нейробластомы SH-SY5Y от индуцированной металлом агрегации β -амилоида и нейрональной токсичности (Yadav et al., 2015). Интересно отметить, что гидроксамовые кислоты могут проявлять нейропротекторные свойства за счет механизмов

несвязанных с ингибированием HDACs, защищая нейроны от окислительного стресса (Sleiman et al., 2014).

1.2. Перспективные направления химической модификации гидроксамовых кислот

Гидроксамовые кислоты являются одним из наиболее изучаемых классов органических соединений не только благодаря широкому спектру их биологической активности, но и благодаря легкости введения гидроксаматной функции в молекулы. Наиболее исследованы гидроксамовые кислоты в роли ингибиторов HDAC, для которых открываются всё новые применения. Перспективным направлением разработки новых препаратов на основе гидроксамовых кислот является модификация CAP области. Такая модификация может служить одной из эффективных стратегий для улучшения профиля ингибирования HDAC путем усиления сродства соединений с поверхностными группами фермента и достижения селективности (Bieliauskas et al., 2016). Многочисленные примеры модификации гидроксамовых кислот можно найти в обзорах (Gupta and Sharma, 2013, Shen and Kozikowski, 2020, Zhan et al., 2017).

Основные химические модификации гидроксамовых кислот направлены на изменение CAP- и линкерной группы. Так, например, описанные в работе (Song et al., 2019) ингибиторы HDAC6 на основе антрахинона не только показывают высокую избирательность действия в отношении изоформ HDACs, но и при воздействии на клетки нейробластомы SH-SY5Y значительно способствуют ацетилированию α -тубулина при концентрации 0,5 μ M, но не ацетилированию гистона H3 вплоть до концентрации 20 μ M. Этот факт подтверждает, что данные соединения являются селективным ингибитором HDAC6-изоформы, что может иметь значение как для поиска противоопухолевых, так и нейропротекторных препаратов.

В работах Feifei Yang et al. была синтезирована новая серия гидроксаматных HDACi на основе кумарина, которые блокируют клеточный цикл клеток линии MDA-MB-231 в G2/M фазе и запускают апоптоз. Среди них было найдено соединение в два-три раза активнее, чем вориностат (Yang et al., 2019, Zhao et al., 2020).

Ряд работ посвящен модификации линкера вориностата в позициях C2 (Negmeldin et al., 2017), C3 (Choi et al., 2011), C4 (Negmeldin et al., 2018), C5 (Negmeldin and Pflum, 2017), C6 (Choi and Pflum, 2012). Как показали проведенные исследования, вводя различные заместители в разные положения линкера, удается получить производные, избирательно действующие на определенные изоформы. Так, C2-н-гексил-SAHА показал субмикромольную активность с 49- и 300-кратной селективностью в отношении HDAC6 и HDAC8 по сравнению с HDAC1, 2 и 3. Интересно, что (R)-C4-бензил-SAHА проявлял 520 и 1300-кратную селективность для HDAC6 и HDAC8 по сравнению с HDAC1, 2 и 3, со значениями IC₅₀ 48 и 27 нМ для HDAC6 и 8 соответственно.

Одно из наиболее интересных направлений модификаций гидроксамовых кислот связано с объединением в одной молекуле фрагмента лекарственного препарата и гидроксаматной группы. Современные методы медицинской химии позволяют легко вводить гидроксаматную группу в молекулы различных природных и синтетических соединений, в том числе известных фармацевтических препаратов. Перспективность таких гибридных лекарственных средств совершенно очевидна, поскольку они не только обладают высокой аффинностью к целевому рецептору, ферменту или целевому молекулярному механизму, но и имеют вероятность получения селективных препаратов (Morphy and Rankovic, 2009). Существует два основных направления – использование «полностью интегрированных» химических структур и использование «векторизованных» структур, включая использование нано- или иных носителей (Fortin and Verube, 2013). Целью синтеза этих гибридных биологически активных молекул является получение

производных, которые будут синергически воздействовать на ту или иную патологию. Очевидно, что «полностью интегрированные» гибриды обладают большим потенциалом, так как их синтез приводит к получению более похожих на лекарство соединений - иными словами, более «drug-like» соединений (Keller et al., 2006).

Несомненным достоинством «полностью интегрированных» молекул на основе гидроксамовой кислоты и известных лекарственных препаратов является сочетанное действие на несколько молекулярных мишеней. Существует несколько эффектных примеров. Так, исследователи группы Rajulu (Rajulu et al., 2014) объединили в одной молекуле фрагмент чрезвычайно успешного антибиотика ципрофлоксацина, обладающего мощной антибактериальной активностью широкого спектра действия и относительно небольшим количеством побочных эффектов, и гидроксамовую кислоту. Полученные производные обладали достаточно высокой эффективностью в отношении клеточных линий аденокарциномы легкого A549 и карциномы толстой кишки HCT-116. В работе (Zhang et al., 2013) описан синтез гибридов колхицин-вориностат с синергетическим противоопухолевым действием ингибиторов тубулина и HDACi. Эти двойные ингибиторы способствуют как ингибированию метастазирования, так и снижению лекарственной устойчивости за счет синергетического эффекта в экспериментах *in vivo*.

Комбинация антрациклиновых антибиотиков с вориностатом или другими ингибиторами HDAC привела к получению соединений двойного действия с ингибированием как HDAC, так и топоизомеразы II (Торо II). Многие из этих гибридных соединений более сильно ингибируют активность HDAC и Торо II по сравнению с вориностатом и дауномицином – стандартными ингибиторами HDAC и Торо II, соответственно (Guerrant et al., 2012).

Путем объединения фармакофоров ингибитора EGFR/HER2 сапитиниба (AZD-8931) и вориностата в одно соединение была

синтезирована новая серия многоцелевых ингибиторов EGFR, HER2 и HDAC (Ding et al., 2017). Соединение **4** (рисунок 4) показало наибольшую ингибирующую активность в отношении EGFR, HDAC1 и HDAC6 со значениями IC_{50} 0,12, 0,72 и 3,2 нМ, соответственно. Оказалось, что соединение **4** регулирует фосфорилирование EGFR и HER2 и гиперацетилирование гистона H3 на клеточном уровне и вызывает апоптоз в клетках BT-474.

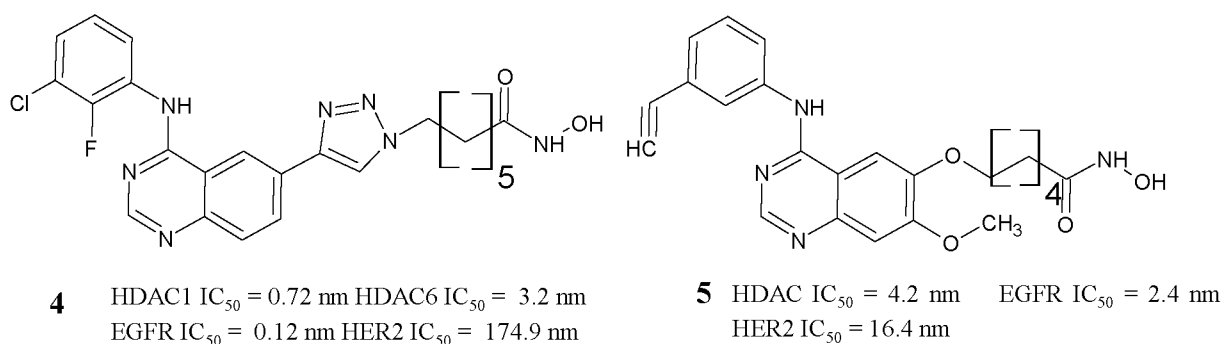


Рисунок 4 – Структуры «полностью интегрированных» молекул на основе гидроксамовой кислоты и известных лекарственных препаратов.

Наиболее успешным многоцелевым гибридным противоопухолевым препаратом является соединение CUDC-101 (соединение **5**, рисунок 4), объединяющее фармакофоры ингибиторов EGFR, HER2 и HDAC (Wang et al., 2013). CUDC-101 эффективно ингибирует активность ферментов киназ EGFR и HER2 и фермента HDAC со значениями IC_{50} 2,4, 15,7 и 4,4 нМ соответственно. Это в десять раз более эффективно, чем ингибитор HDAC вориностат и ингибитор EGFR эрлотиниб, и сравнимо с активностью ингибитора HER2 лапатиниб. Кроме того, в опухолевых клетках CUDC-101 увеличивает ацетилирование p53 и α -тубулина, негистоновых субстратов HDAC. Таким образом, CUDC-101 эффективно ингибирует все три мишени в раковых клетках, что позволило ввести его в клинические испытания (Shimizu et al., 2014).

Таким образом, гидроксамовые кислоты представляют собой крайне разнообразный по строению класс органических соединений. Основные биологические свойства соединений данного класса связаны с их способностью хелатировать ионы металлов и образующими Н-связь свойствами. Благодаря таким свойствам гидроксамовые кислоты являются эффективными ингибиторами металлопротеаз, в первую очередь семейства гистоновых деацетилаз (HDACs). В соответствии с этим наиболее изучено участие ингибиторов на основе гидроксамовой кислоты в канцерогенезе и поиске противоопухолевых препаратов, где показана их эффективность в индукции апоптоза, в первую очередь по пути митохондриально зависимого апоптоза, окислительного стресса и нарушения функциональных характеристик митохондрий.

В последнее время гидроксамовые кислоты активно исследуются и как нейропротекторные препараты, причем на передний план выходит не их способность ингибировать соответствующие изоформы HDACs, а способность проявлять нейропротекторные свойства за счет защиты от окислительного стресса, предотвращать фрагментацию митохондрий, защищать дофаминэргические нейроны от повреждения, вызванного нейротоксинами. Это подтверждается многочисленными экспериментами, в том числе и на генно-модифицированных моделях *in vivo*. Разработанные методы медицинской химии позволяют вводить в молекулу гидроксамовых кислот различные фармакофорные фрагменты, повышающие целевую активность, например, фрагменты антиоксидантов. Наиболее интересным направлением модификации гидроксамовых кислот является объединение в одной молекуле фрагментов известных лекарственных препаратов, высокоаффинных по отношению к дополнительным молекулярным мишеням, и гидроксамовой кислоты. Такие модификации позволяют получать многоцелевые гибридные молекулы, воздействующие на специфические молекулярные мишени опухолевых и нейродегенеративных заболеваний. Таким образом, гидроксамовые кислоты представляют собой эффективные

инструменты для модуляции онкологических и нейродегенеративных патологий, воздействуя на молекулярные мишени и механизмы, связанные с окислительным стрессом, функционированием митохондрий и ферменты эпигенетической регуляции.

1.3. Окислительный стресс в развитии и прогрессировании нейродегенеративных и онкологических патологий

Окислительному стрессу всегда придавалось решающее значение в развитии различных патологий. Данный процесс заключается в нарушении окислительно-восстановительного баланса, что приводит к потенциальному повреждению биологических мембран (Chiurchiu et al., 2016) и является следствием избыточного накопления активных форм кислорода (АФК), а также сниженной активности антиоксидантной системы защиты клеток (Yu et al., 2009). Интенсификация процессов перекисного окисления и снижение способности эндогенной системы защиты нейтрализовать свободные радикалы приводят к окислительным повреждениям, таким как посттрансляционные модификации, окисление липидов, белков и ДНК/РНК, что является общими чертами многих заболеваний (Aliev et al., 2008, Bhat et al., 2015, Sieradzki et al., 2011). Особо важную роль в системе клеточной регуляции играет процесс перекисного окисления липидов, который рассматривается в качестве основного молекулярного механизма, участвующего в окислительном повреждении клеточных структур (Gaschler and Stockwell, 2017).

В инициации процесса перекисного окисления липидов при различных патологических состояниях принимают участие различные окислители, в частности пероксид водорода (H_2O_2), супероксидный анионный радикал ($O_2^{\cdot-}$) и высокореактивные гидроксильные радикалы (Bansal and Simon, 2018). Кроме того, существуют доказательства того, что при различных патологических состояниях в организме человека отмечается нарушение

гомеостаза железа (Berg et al., 2001, Parkkila et al., 2001, Rasmussen et al., 2001, Ward et al., 2014), являющегося мощным прооксидантом и генератором активных форм кислорода (Carocci et al., 2018). Так, избыток ионов двухвалентного железа (Fe^{2+}) оказывает токсическое действие из-за своей способности вступать в окислительно-восстановительные реакции, например реакцию Фентона и запускать превращение перекиси водорода в гидроксильный радикал (OH^{\bullet}) и гидроксид-анион (OH^{-}) (Attard et al., 2008, Brewer and Wallimann, 2000).

Маркерами процесса перекисного окисления липидов являются его конечные продукты: малоновый диальдегид (МДА) и 4-гидрокси-транс-2,3-ноненаль (4-HNE) (Jinsmaa et al., 2009), повышение уровня которых регистрируется уже на ранних стадиях нейродегенеративных заболеваний и возрастает пропорционально тяжести патологии (Bansal and Simon, 2018, Greilberger et al., 2008), а также отмечается у пациентов с онкопатологиями (Tsukanov et al., 2018). В то же время анализируемым параметром, позволяющим регистрировать интенсивность окислительных процессов является и работа собственной антиокислительной защиты клетки, в частности, глутатионовой системы (Bansal and Simon, 2018). Нарушения гомеостаза антиоксиданта глутатиона, который является поставщиком электронов для глутатионпероксидазы (GPx) – фермента, осуществляющего детоксикацию пероксида водорода и органических перекисей (Fiser et al., 2011), обнаруживаются при различных патологиях, в частности, нейродегенеративных расстройствах и онкологических заболеваниях.

1.4. Роль гидроксамовых кислот в модуляции окислительного стресса при нейродегенерации и злокачественных новообразованиях

Одной из перспективных стратегий при разработке лекарственных средств, направленных на лечение онко- и нейропатологий, является поиск соединений, способных модулировать окислительные процессы. Такими

соединениями могут быть гидроксамовые кислоты, способные регулировать уровни активных форм кислорода, хелатировать ионы переменной валентности и влиять на активность элементов собственной антиоксидантной системы защиты клетки.

На рисунке 5 представлена схема регуляции гидроксамовыми кислотами процессов, связанных с окислительным стрессом при развитии онкологических и нейродегенеративных патологий.

Olson с коллегами описали нейропротекторные свойства соединений на основе гидроксамовой кислоты и показали способность защищать зрелые кортикальные нейроны от вызванного H_2O_2 окислительного стресса веществами данного класса (Olson et al., 2015). Кроме того, исследование соединений PCI-34051 и BRD3811 в тесте истощения глутатиона, моделирующем окислительный стресс, показало их эффективность в подавлении оксидативных процессов в первичных кортикальных нейронах мышей (Sleiman et al., 2014). Следует отметить, что в ряде случаев нейропротекторные эффекты проявляются в концентрациях много ниже IC_{50} ингибирования HDAC.

Ранее также было показано, что соединения класса гидроксамовых кислот трихостатин А, вориностат и скриптаид защищают нервные клетки от снижения уровня глутатиона, приводящего к гибели нейронов (Langley et al., 2008, Ryu et al., 2003, Sleiman et al., 2011). Экспериментальные результаты, полученные Guo с коллегами в ходе *in vitro* скрининга непосредственно антиоксидантных свойств трихостатина А, показали для него достоверное снижение уровня малонового диальдегида в системе. Это свидетельствует о способности трихостатина А подавлять процесс перекисного окисления липидов и, как следствие, препятствовать избыточной продукции активных форм кислорода (Guo et al., 2017).

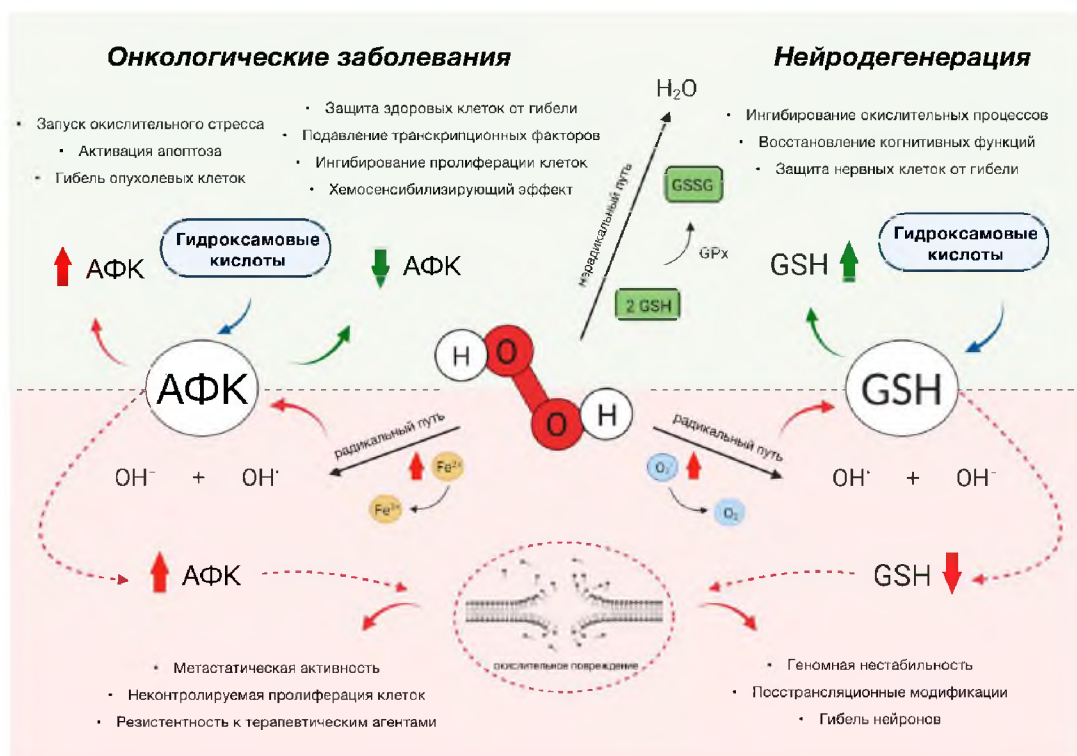


Рисунок 5 – Регуляция гидроксамовыми кислотами процессов, связанных с окислительным стрессом при развитии онкологических и нейродегенеративных патологий. Гидроксамовые кислоты способны увеличивать концентрацию глутатиона (доминирующего антиоксиданта эндогенной протекторной системы) и тем самым ослаблять свободнорадикальные реакции. В случае нейропатологий антиоксидантный потенциал гидроксамовых кислот проявляется в ингибирующем действии на окислительные процессы, защищая нервные клетки от апоптоза и снижая когнитивные нарушения. Также антиокислительные свойства гидроксамовых кислот могут приводить к ряду положительных эффектов и в терапии онкозаболеваний. Для ряда гидроксамовых кислот также показан и прооксидантный эффект, заключающийся в увеличении продукции АФК и приводящий к запуску процессов, связанных с окислительным стрессом, активацией апоптоза и гибелью опухолевых клеток.

Интерес вызывает использование антиоксидантов и в терапии онкозаболеваний. В последнее время активно обсуждается их способность предотвращать развитие онкологических патологий посредством запуска

апоптоза за счёт влияния на модуляцию клеточного цикла, воспаление, ингибирование пролиферации и инвазивной активности неопластических клеток (Valko et al., 2007), и, что немаловажно, снижать токсический эффект в отношении нетрансформированных клеток организма. Существует предположение, что противоопухолевое действие потенциальных антиоксидантов может быть связано с эффективным ингибированием ими сверхактивированных транскрипционного фактора NFκB и мутагенного белка p53, стимулирующих канцерогенез (Bonner and Arbiser, 2014).

Известно, что изменения в метаболической активности опухолевых клеток приводят к интенсивной продукции активных форм кислорода и являются причиной повреждения ДНК, что способствует генетической нестабильности и развитию устойчивости трансформированных клеток к химиотерапии, развитию феномена множественной лекарственной устойчивости (Mut-Salud et al., 2016). Перспективность использования гидроксамовых кислот в качестве потенциальных онколитиков или сенсбилизаторов клинических цитостатиков может быть так же обусловлена наличием антиоксидантных свойств для соединений данного класса. Так, была показана адьювантная активность спироциклической гидроксамовой кислоты на основе валина в комплексной терапии лимфолейкоза P388 в сочетании с циклофосфаном и цисплатином в низкоэффективных дозах. Выявлена корреляция данного эффекта со способностью гидроксамовой кислоты хелатировать ионы Fe(II), вступающих в реакцию Фентона, тем самым проявляя ингибирующее действие в отношении перекисного окисления липидов (Mishchenko et al., 2018).

Помимо антиоксидантного действия для соединений на основе гидроксамовой кислоты отмечается прооксидантный эффект, который также рассматривается как один из механизмов элиминации неопластических клеток. Гидроксамовые кислоты, обладающие прооксидантным эффектом, способны инициировать окислительный стресс, запуская процессы клеточной гибели по пути апоптоза (Huang et al., 2018). Существуют данные,

свидетельствующие о том, что при некоторых типах опухолей наблюдается повышенный уровень активности компонентов глутатионовой системы, что приводит к снижению продукции активных форм кислорода вследствие ингибирования окислительного стресса (Lu, 2009, Wu et al., 2004). Всё это приводит к неконтролируемой пролиферации злокачественных клеток и избеганию ими апоптоза (Li et al., 2014), а также повышению метастатического потенциала и устойчивости опухолей к химиотерапии (Carretero et al., 1999, Huang et al., 2001). В связи с этим индуцирование окислительного стресса и стимуляция апоптоза является целью многих методов лечения определенных видов онкопатологий.

Так, в работе Huang с соавторами было показано, что дроксиностат эффективно подавляет рост клеточных линий аденокарциномы толстой кишки человека (HT-29 и HCT 116) и их колониеобразующую способность за счёт индукции апоптоза в клетках вследствие запуска окислительного стресса, избыточной продукции активных форм кислорода и снижении экспрессии генов, кодирующих ферменты собственной антиоксидантной защиты (Huang et al., 2018). Подобный эффект был обнаружен для вориностата в исследованиях Shi и коллег на опухолевых клеточных линиях рака предстательной железы (DU145 и PC-3) (Shi et al., 2017), а в работах You и Park регистрировалось ингибирование вориностатом роста клеток рака шейки матки (HeLa), сопровождающееся повышением внутриклеточного уровня свободных радикалов (главным образом, супероксидного анионрадикала, $O_2^{\cdot-}$) и истощением глутатиона (You and Park, 2014). Кроме того, 24-часовая инкубация клеточных линий рака лёгкого (A549, Calu-6, SK-LU-1, HCC-1588 и NCI-H1299) с вориностатом, также приводила к гиперпродукции активных форм кислорода и снижению количества глутатиона, вызывая гибель неопластических клеток (You and Park, 2017) и, что немаловажно, не влияла на нетрансформированные клетки HSAEC и HPF (You et al., 2017). Аналогичные свойства были продемонстрированы и для

субероил бис-гидроксамовой кислоты (SBHA) на клетках аденокарциномы лёгкого человека (A549) (You et al., 2015).

Помимо компонентов, входящих в систему антиоксидантной защиты, важную роль в регуляции процессов, связанных с окислительным стрессом, играют ферменты семейства липоксигеназа (LOX), катализирующие окисление полиненасыщенных жирных кислот до соответствующих гидропероксидов. Так, повышенная активность и сверхэкспрессия генов, кодирующих данный фермент и, как следствие, интенсивное окисление полиненасыщенных жирных кислот, может приводить к избыточному накоплению гидроксикозатетраеновых кислот (HETEs) и гидропероксиэйкозатетраеновых кислот (HPETEs) с мощными стимулирующим рост, хемотаксическим, воспалительным и ангиогенным эффектами (Orafaie et al., 2018).

В связи с этим ингибирование фермента липоксигеназа представляет собой перспективный подход при поиске потенциальных терапевтических агентов, содержащих в своей структуре фрагмент гидроксамовой кислоты и направленных на фармакологическую коррекцию онкологических заболеваний.

На рисунке 6 представлена схема регуляции гидроксамовыми кислотами процессов, связанных с нарушением работы фермента липоксигеназа при развитии онкологических заболеваний.

Влияние гидроксаматной функции на активность фермента 5-липоксигеназа всегда вызывало интерес исследователей. Так, в работе Summers и коллег были обнаружены ингибирующие свойства серии производных *w*-фенилалкиловых и *w*-нафтилалкиловых гидроксамовых кислот по отношению к 5-LOX. При этом количественный анализ взаимосвязи «структура-активность» показал, что доминирующим признаком, ответственным за снижение активности данного фермента является способность хелатировать металл, расположенный в каталитическом центре фермента (Summers et al., 1987). В дальнейшем их исследование было

дополнено более чем 100 новыми соединениями, в частности, бензо- и нафтогидроксамовыми кислотами с различными заместителями, арилакрилгидроксамовыми кислотами и арилалкилгидроксамовыми кислотами с разветвленными или прямоцепочечными алкильными спейсерами и показано, что большинство из них ингибировали 5-липоксигеназу, при этом эффективность в значительной степени определялась гидрофобностью молекул (Summers et al., 1990).

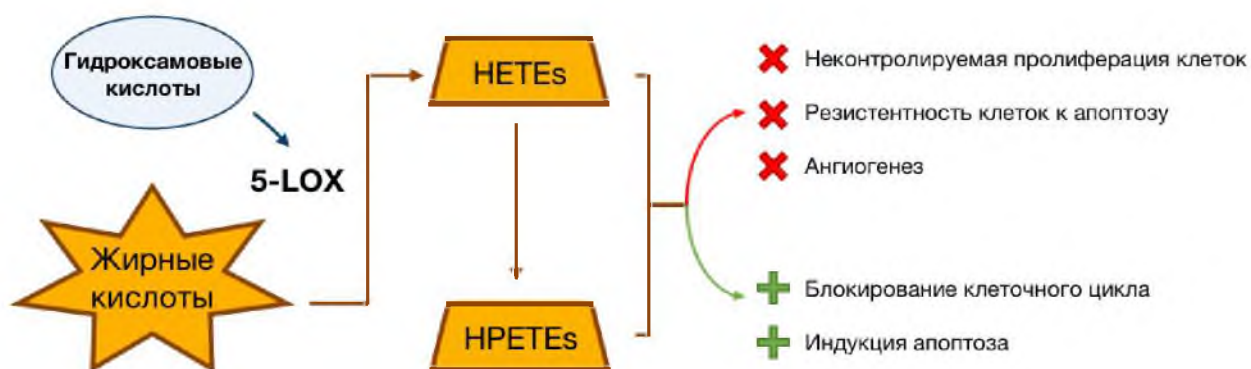


Рисунок 6 – Регуляция гидроксамовыми кислотами процессов, связанных с нарушением работы фермента липоксигеназа при развитии онкологических заболеваний. Гидроксамовые кислоты способны ингибировать активность липоксигеназы, что приводит к снижению продукции гидроксикозатетраеновых (HETEs) и гидропероксиэйкозатетраеновых (HPETEs) кислот. Такая способность соединений данного класса модулировать работу фермента оказывает положительные эффекты при лечении онкопатологий, блокируя клеточный цикл опухолевых клеток и вызывая апоптоз.

Connolly с коллегами в своих исследованиях продемонстрировали эффективную ингибирующую активность фермента 5-LOX двух серий гибридных соединений на основе ингибитора COX/5-LO пиразолсодержащей гидроксамовой кислоты тепоксалина и ингибитора 5-LO АВТ-761 на клеточной линии базофильной лейкемии крысы (RBL-1), что отражалось в

снижении продукции 5-гидроксикозатетраеновой кислоты (Connolly et al., 1999). На клеточной линии колоректальной аденокарциномы человека (HCT116) также был изучен противоопухолевый потенциал (в частности, влияние на уровень 5-липоксигеназы) производного гидроксамовой кислоты – соединения МНУ218. Было установлено, что концентрация 5-ЛОХ в клетках, обработанных МНУ218, была значительно снижена по сравнению с контролем. Такая ингибирующая активность вещества по отношению к данному ферменту коррелирует с подавлением роста неопластических клеток линии HCT116 и индукцией апоптоза (Kim et al., 2014). Остановка клеточного цикла и запуск апоптотической гибели клеток производным гидроксамовой кислоты МНУ218 связана с его ингибированием ядерной транслокации NF-κB, что приводит к снижению экспрессии NF-κB-регулируемых нисходящих целевых генов, кодирующих, в частности, фермент 5-липоксигеназу (Chopra et al., 1992).

Таким образом, в связи с тем, что окислительному стрессу отводится ключевая роль в развитии таких патологических состояний организма, как онкологические и нейродегенеративные заболевания (Aliev et al., 2014, Nunomura et al., 2001), манипуляция количеством активных форм кислорода, уровнями и активностью ферментов эндогенной антиоксидантной защиты клетки и липоксигеназы соединениями класса гидроксамовых кислот может представлять собой перспективный вариант лечения данных заболеваний и облегчения сопутствующих им симптомов.

1.5. Значение митохондриальной дисфункции и перепрограммирования метаболического состояния при нейродегенерации и онкопатологии

Несмотря на то, что онкологические и нейродегенеративные заболевания являются различными классами заболеваний человека, в каскаде событий развития патологии и в том, и в другом случае важную роль играют митохондрии (Aliev et al., 2013, Lin and Beal, 2006, Magri et al., 2018). Данные

органеллы являются важнейшим источником энергии, необходимой для поддержания гомеостаза эукариотических клеток, а нарушение их функционирования приводит к запуску каскада клеточной гибели (Kholmukhamedov and Jobe, 2017). Действительно, при нейродегенерации и онкологии наблюдается дисрегуляция данных путей. Если при неопластическом процессе ключевыми элементами для неконтролируемой пролиферации и поддержании роста опухолевых клеток являются высокая скорость гликолиза (эффект Варбурга) (Brahimi-Horn et al., 2007) и подавление процессов апоптоза, то при нейродегенеративных заболеваниях отмечается противоположная ситуация – митохондриальная дисфункция и повышенная гибель клеток (Eckert et al., 2011, Wang et al., 2019).

Митохондрии играют ключевую роль как во внутренних, так и во внешних путях апоптоза. Они содержат множество проапоптотических факторов, включая цитохром с (Cyt c), AIF и Smac/Diablo, высвобождение которых в цитозоль приводит к активации каскада каспаз (Wang and Youle, 2009). Это происходит за счет нарушения целостности митохондриальной мембраны под действием различных стимулов, таких как повышенный цитоплазматический уровень Ca^{2+} , окислительный стресс и накопление свободных радикалов, повреждения ДНК, гипоксия и других (Keeble and Gilmore, 2007, Kroemer and Zitvogel, 2007, Le Bras et al., 2005).

Ещё одним биохимическим маркером патологических изменений в опухолевых клетках является измененный энергетический метаболизм. Этот метаболический фенотип характеризуется предпочтительной зависимостью от гликолиза (процесс превращения глюкозы в пируват с последующим образованием лактата) для производства энергии независимым от кислорода образом. И хотя гликолиз менее эффективен, чем окислительное фосфорилирование в получении аденозинтрифосфата (АТФ), опухолевые клетки адаптируются за счет увеличения поглощения глюкозы, что, в свою очередь, способствует более высокой скорости гликолиза. Помимо обеспечения клеточной энергии, метаболические промежуточные продукты

гликолиза также играют ключевую роль в биосинтезе макромолекул, тем самым предоставляя селективное преимущество опухолевым клеткам в условиях ограниченного снабжения питательными веществами. Таким образом, нацеливание на гликолиз является привлекательным патологическим процессом для терапевтического вмешательства при поиске перспективных онколитиков. Большое количество исследований действительно продемонстрировало эффективность такого терапевтического подхода, тем самым подтвердив его научное обоснование (Abbaszadeh et al., 2020).

1.6. Влияние гидроксамовых кислот на функционирование митохондрий и метаболизм клеток при нейропатологии и онкологических заболеваниях

Модуляция различных функций митохондрий является перспективным подходом к контролю процесса запуска каскада гибели клетки. При нейродегенеративных заболеваниях целью является поиск веществ обладающих антиапоптотическим действием, способных защитить нейроны от гибели. При онкологических патологиях ситуация обратная: необходимы соединения, модулирующие ключевой путь получения энергии - гликолиз, снижающие резистентность опухолевых клеток к апоптозу и прерывающие процесс бесконечной неконтролируемой пролиферации.

На рисунке 7 представлена схема регуляции гидроксамовыми кислотами процессов, связанных с запуском каскада гибели клеток по митохондриальному пути апоптоза при развитии онкологических заболеваний и нейропатологий.

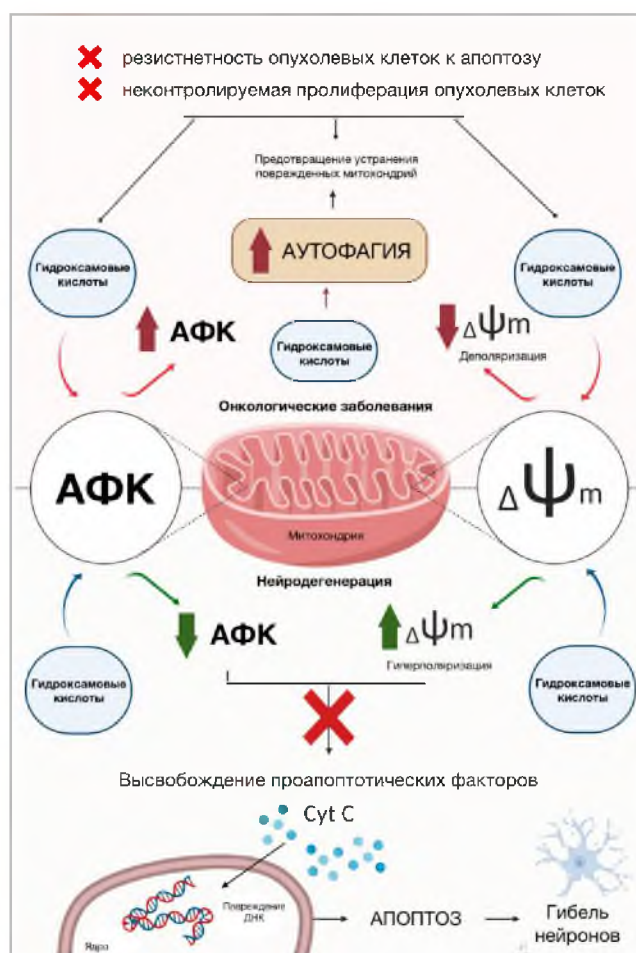


Рисунок 7 – Регуляция гидроксамовыми кислотами процессов, связанных с запуском каскада гибели клеток по митохондриальному пути апоптоза при развитии онкологических заболеваний и нейропатологий. Соединения данного класса способны снижать резистентность опухолевых клеток к апоптозу и прерывать процесс их неконтролируемой пролиферации за счёт гиперпродукции активных форм кислорода и значительного снижения митохондриального мембранного потенциала, а также активации аутофагии. При фармакологической коррекции нейродегенеративных заболеваний для гидроксамовых кислот характерен противоположный эффект: снижение содержания свободных радикалов и гиперполяризация митохондриальной мембраны, что защищает нейроны от гибели.

В настоящее время существует небольшое количество экспериментальных данных о способности соединений класса гидроксамовых кислот ингибировать процессы, связанные непосредственно с

запуском каскада гибели клеток по митохондриальному пути апоптоза, с целью лечения нейропатологий. Так, для гидроксамовой кислоты трихостатина А – специфического ингибитора гистондеацетилазы клеток млекопитающих – была показана антиоксидантная и митопротекторная активность. Это проявлялось в снижении уровня малонового диальдегида, увеличении активности супероксиддисмутазы (СОД) и восстановлении мембранного потенциала $\Delta\psi_m$ митохондрий после воздействия деполяризатора – перекиси водорода. Кроме того, трихостатин А увеличивал экспрессию транскрипционного фактора FoxO3a, SOD2 и каталазы, таким образом, подтверждая свою способность защищать клетки в условиях действия различных токсинов, вызывающих окислительный стресс и митохондриальную дисфункцию (Guo et al., 2017).

Исследованиям способности гидроксамовых кислот модулировать функциональные характеристики митохондрий в терапии онкопатологий посвящено большее количество работ, поскольку в последние годы интерес к использованию соединений данного класса, как мультифункциональных агентов для лечения онкологических заболеваний, включая различного типа злокачественные новообразования, такие как меланома, лимфолейкоз, карцинома и многие другие, только растёт. Так, например, в качестве многообещающего терапевтического средства против солидных опухолей в работе (Arts et al., 2009) авторы предлагают вещество JNJ-26481585, гидроксамовую кислоту «второго поколения». Для данного вещества, помимо высокой ингибирующей способности по отношению к ферментам гистоновые деацетилазы в качестве основного механизма противоопухолевого действия в отношении клеток рабдомиосаркомы показано прямое влияние на митохондриальные характеристики с последующим запуском каскада клеточной гибели по пути апоптоза. JNJ-26481585 запускает процесс перехода проницаемости наружной митохондриальной мембраны (MOMP) и значительно увеличивает потерю митохондриального мембранного потенциала в зависимости от времени. В

качестве дополнительного параметра митохондриальной апоптотической передачи сигналов для данной гидроксамовой кислоты показана активация Bax и Bak, двух междоменных проапоптотических белков семейства Bcl-2, которые контролируют MOMP и включают активацию каспаз через митохондриальный путь (Heinicke et al., 2016).

Еще одним примером модулятора функциональных характеристик митохондрий служит субероил бис-гидроксамовая кислота SBHA. SBHA, вызывая изменения проницаемости наружной митохондриальной мембраны, приводит к высвобождению митохондриальных проапоптотических белков, которые в свою очередь активируют каспазу 9 с последующим запуском апоптоза в клетках меланомы (Zhang et al., 2003). Это было продемонстрировано в снижении митохондриального мембранного потенциала $\Delta\psi_m$ и высвобождении цитохрома C и Smac/Diablo из митохондрий в цитозоль после воздействия SBHA. Дополнительные доказательства в поддержку роли митохондрий в SBHA-индуцированном апоптозе были получены в исследованиях с клетками со сверхэкспрессированными белками семейства Bcl-2. Уровни индуцированного SBHA апоптоза в трансфектантах Bcl-2 были заметно снижены, так же как и индуцированные SBHA изменения в DCm, активации каспазы-3 и расщеплении CAD и PARP (Zhang et al., 2003).

Считается, что транслокация Bax из цитозоля в митохондрии играет ключевую роль в индукции апоптоза различными апоптотическими стимулами (Gross et al., 1999). Транслокация Bax включает конформационные изменения, при которых NH_2 - и COOH -конец становятся несвязанными и доступными для взаимодействия с Bax-, NH_2 -терминальными эпитоп-специфическими антителами (Desagher et al., 1999, Gross et al., 1998, Hsu and Youle, 1998, Nechushtan et al., 1999). Исследования конформационного статуса Bax в клетках меланомы под воздействием SBHA с использованием антитела, направленного против NH_2 -концевой области Bax, показали увеличение изменения конформации Bax после обработки

SBHA, что соответствовало уровню развития апоптоза в клетках. Механизмы, лежащие в основе изменения конформации Bax, по-видимому, не зависят от каскада каспаз в том смысле, что изменение конформации Bax было зафиксировано после воздействия SBHA независимо от ингибирования активности каспаз (Zhang et al., 2003).

Схожие данные были получены Во Ра You с соавторами в экспериментах на клетках A549, трансфицированных м-РНК, связанной с системой тиоредоксин/тиоредоксинредуктазы TRX для подавления уровня Trx1, TrxR1, Trx2 и TrxR2 белков. При обработке данных клеток гидроксамовой кислотой SBHA наблюдалось снижение мембранного потенциала митохондрий, приводящее к митохондриальной дисфункции и повышение уровня свободных радикалов, нарушающих также целостность митохондриальной мембраны. Это приводило к высокой цитотоксической активности SBHA по отношению к культуре клеток A549 в независимости от системы TRX (You et al., 2015).

Появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что в опухолевых клетках аутофаггено-лизосомальный путь объединяет сигналы от различных событий, что приводит к сложному регулирующему механизму, затрагивающему в первую очередь митохондрии, который может завершиться гибелью или выживанием клеток (Haberland et al., 2010, Montgomery et al., 2009). Показано, что активация аутофагии ингибирует начало апоптоза, однако в некоторых случаях аутофагия также может играть аддитивную роль в процессе гибели клеток (Jung et al., 2009). Точнее, чрезмерное «самосъедание» через аутофагию и накопление аутофагосом может способствовать смерти как отдельных митохондрий, так и клеток в целом. В этом контексте известно, что лизосомотропные агенты, такие как хлорохин, увеличивают лизосомальный pH, что приводит к ингибированию слияния аутофагосомы с лизосомой, за чем следует гипераккумуляция аутофагических вакуолей, которые ускоряют гибель апоптотических клеток. Чаще всего гидроксамовые кислоты индуцируют апоптоз за счет нарушения

нормального функционирования митохондрий, что приводит к высвобождению проапоптотических факторов в цитозоль (Richa et al., 2020). Также сообщается, что такие гидроксамовые кислоты, как вориностат, действуют как ингибиторы мишени рапамицина (mTOR), тем самым нарушая клеточный цикл и усиливая аутофагию (Hrzenjak et al., 2008).

В ряде исследований было обнаружено, что комбинированное лечение вориностатом и хлорохином привело к увеличению накопления поврежденных митохондрий в клетках человеческой глиомы U87MG, значительному увеличению уровня свободных радикалов и снижению потенциала митохондриальной мембраны, тем самым вызывая апоптоз. Также было обнаружено, что ингибирование аутофагии на поздней стадии, но не на ранней стадии, усиливает цитотоксический эффект вориностата через апоптоз. Это исследование описывает клеточные и молекулярные механизмы комбинированного эффекта вориностата и хлорохина, которые могут быть использованы в качестве терапевтической стратегии для лечения глиобластомы в будущем (Mrakovcic et al., 2017).

В работе (Lu et al., 2016) было показано, что SAHA в комбинации с ингибитором протеасом MG132 синергетически подавляют пролиферацию, гликолиз и митохондриальное окисление, вызывают остановку клеточного цикла и апоптоз в клетках карциномы желудка человека MGC-803 и MKN28. Было также обнаружено, что одним из клеточных путей, участвующих в росте клеток плоскоклеточной карциномы пищевода ESCC, благодаря чему дефероксамин проявляет сильные противоопухолевые свойства, является подавление митохондриального дыхания и аэробного гликолиза (Lan et al., 2018).

Таким образом, вышеизложенные данные свидетельствуют о перспективности использования соединений класса гидроксамовых кислот в качестве модуляторов митохондриальных характеристик и метаболических состояний клеток при поиске потенциальных противоопухолевых агентов. В то же время гидроксамовые кислоты являются не менее интересным

объектом для исследования подобной активности и при разработке нейропротекторов, нацеленных на предотвращение или замедление развития нейродегенеративных состояний.

1.7. Роль модификаций гистонов в регуляции экспрессии генов, патогенетически значимых для развития нейродегенеративных и онкологических заболеваний

1.7.1. Гистоны: структура, функции, посттрансляционные модификации

Белки гистоны являются важными компонентами нуклеосом, и их ацетилирование тесно связано со структурой хроматина и электростатическим взаимодействием с ДНК (Millan-Zambrano et al., 2022).

Выделяют шесть основных типов гистонов: H1, H2A, H2B, H3, H4 и H5. Они чрезвычайно богаты положительно заряженными аминокислотами – лизином и аргинином. Нуклеосомные гистоны относятся к числу наиболее консервативных белков. Их аминокислотные последовательности имеют почти 100%-ную гомологию у всех эукариотических организмов.

Нуклеосома является фундаментальной единицей хроматина, состоящей из двух тетрамерных комплексов повторяющихся гистонов H2A, H2B, H3 и H4 – нуклеосомного кора (Arimura et al., 2021, Yuan et al., 2022). Между собой октамерные единицы соединены линкерным участком, состоящим из H1 или в редких случаях H5 (в неактивных ядрах эритроцитов птиц), и упакованы с образованием фибрилл размером 30 нм. Далее фибриллы упаковываются в петельные домены, розетки, спираль и хроматиды (Singh and Mueller-Planitz, 2021) (рисунок 8). Иными словами, линкерные гистоны H1 и H5 участвуют в стабилизации хромосом, создавая структуры более высокого порядка (Yusufova et al., 2021). Их ацетилирование связано с образованием гетерохроматина и активацией транскрипции.

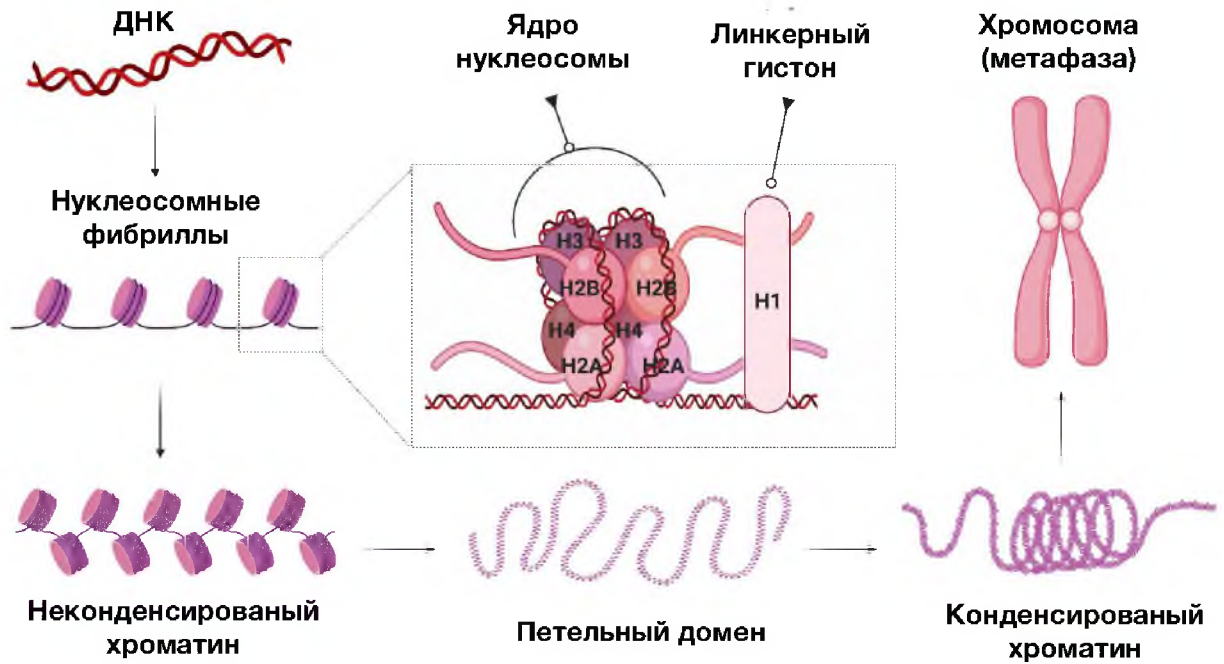


Рисунок 8 – Схематичное изображение уровней организации хроматина и строение структурной единицы хроматина – нуклеосомы. Нуклеосома представляет собой октамер, содержащий по две копии каждого из коровых гистонов (H2A, H2B, H3, H4) – нуклеосомный кор. Между собой нуклеосомы соединены линкерным участком H1, связывающимся с внешней стороной белковой глобулы и участвующим в формировании нуклеосомных фибрилл. Дальнейшая упаковка хроматина даёт формирование новых структур с образованием в итоге метафазных хромосом.

Таким образом, процессы, происходящие с ДНК, такие как транскрипция и архитектура хроматина, зависят от конфигурации гистонов. Эухроматин имеет рыхлую конфигурацию, которая облегчает процесс транскрипции. Этот регион обычно содержит гены высокой экспрессии. Наоборот, гетерохроматин имеет более плотную конфигурацию. Эпигенетическая модификация может быть одним из биомаркеров при распознавании хроматина различного типа, например, эухроматин может иметь высокий уровень ацетилирования, в то время как уровень ацетилирования гетерохроматина, напротив, низкий.

На сегодняшний день обнаружено большое разнообразие гистоновых модификаций, играющих важную роль в регуляции состояния хроматина, позволяя контролировать процессы транскрипции и непосредственно поддерживать необходимое состояние хроматина в ходе пролиферации клеток. Среди таких посттрансляционных модификаций выделяют метилирование, ацетилирование, сумоилирование, гликозилирование, фосфорилирование, поли-АДФ-рибозилирование и убиквитинирование. Хорошо известно, что дерегуляция этих процессов ведёт к инициации и прогрессированию онкологических состояний, в частности, за счет усиления активации онкогенов или, наоборот, подавления активности опухолевых супрессоров. К наиболее изученной эпигенетической модификации с доказанной ролью в патогенезе широкого спектра заболевания относятся процессы деацетилирования белков гистонов.

1.7.2. Деацетилирование гистонов, HDACs

Деацетилирование - это процесс, при котором происходит сближение белков гистонов из-за образования компактной структуры нуклеосом, что приводит к предотвращению активации транскрипции гена (рисунок 9). Деацетилирование лизина катализируется ферментами гистоновыми деацетилазами, которые отщепляют ацетильную группу от лизина гистоновых белков (Hu et al., 2022).

На сегодняшний день идентифицировано 18 представителей человеческих HDACs, которые в зависимости от клеточной локализации и количества каталитически активных центров сгруппированы в четыре класса. Удаляя ацетильные группы из остатков 1-аминогруппы лизина на хвостах гистонов, HDACs играют решающую роль в регуляции транскрипции (Daško et al., 2022).

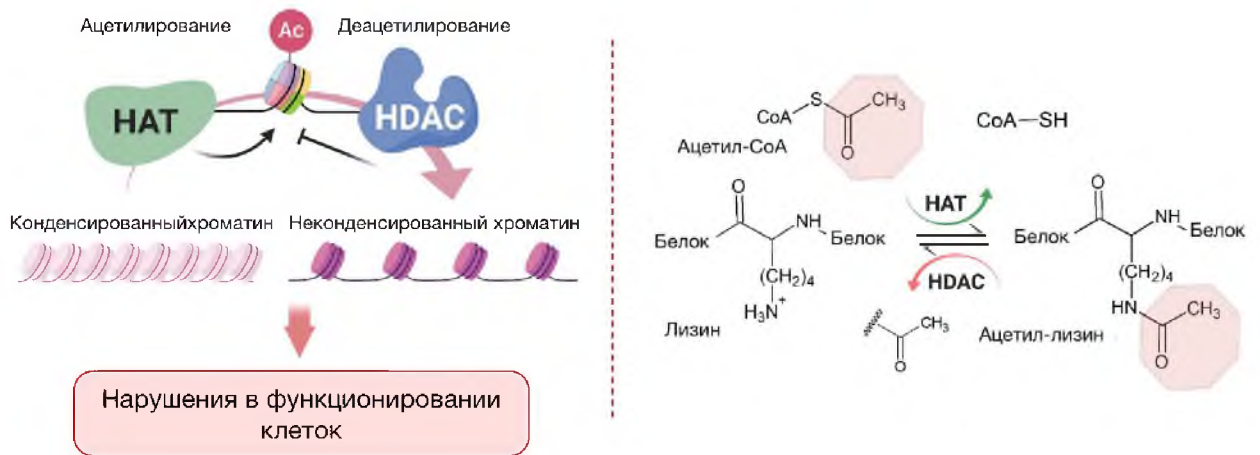


Рисунок 9 – Схема механизмов ацетилирования и деацетилирования гистонов. Баланс ацетилирования гистонов контролируется с помощью гистонацетилтрансфераз (HAT) и гистондеацетилаз (HDAC). Деацетилирование лизина гистонов приводит к расслаблению структуры хроматина и активации транскрипции, что может вызвать нарушения в функционировании клеток.

Класс I — Rpd3-подобные ферменты — состоит из HDAC1, 2, 3 и 8. Hda1-подобные ферменты класса II дополнительно подразделяются на два подкласса: IIa (HDAC4, 5, 7 и 9) и IIb (HDAC6 и 10). SIRT2-подобные ферменты класса III состоят из семи сиртуинов, которые являются NAD-зависимыми белковыми деацетилазами и/или ADP-рибозилазами. Было показано, что сиртуины регулируют многие клеточные процессы, включая выживание, старение, реакцию на стресс и обмен веществ. Класс IV содержит только HDAC11, которая имеет сходство последовательностей с белками класса I и II.

HDAC класса I повсеместно экспрессируются во всех тканях. Они преимущественно локализуются в ядерном компартменте клетки и являются катализаторами отщепления ацетильного остатка от лизина гистонов. HDAC1 и HDAC2 очень похожи и участвуют во многих клеточных процессах, таких как пролиферация, клеточный цикл и апоптоз (Sabnis, 2021). Во всем организме они, по-видимому, играют критическую роль в развитии и

физиологии (Kumar et al., 2022). Структура белка HDAC класса I характеризуется высококонсервативным деацетилазным доменом с фланкированными короткими амино- и карбокси-концевыми участками (Maug et al., 2021). HDAC класса I обнаружены как часть мультибелковых комплексов, привлеченных к генам-мишеням для обеспечения репрессии. HDAC1 и HDAC2 являются каталитическими субъединицами комплексов Sin3, Mi-2/NurD и CoREST, тогда как HDAC3 в основном рекрутируется комплексом N-CoR/SMRT. Известно, что HDAC3 играет роль в процессах клеточного цикла и реакции повреждения ДНК (Reichert et al., 2012). Наконец, HDAC8 преимущественно обнаруживается в цитозоле и экспрессируется в клетках, демонстрирующих дифференцировку гладких мышц. HDAC8 до сих пор не был описан как член какого-либо белкового комплекса (Yang and Seto, 2008).

В отличие от HDAC класса I, HDAC класса IIa экспрессируются тканеспецифичным образом и участвуют в дифференцировке и развитии. Они осуществляют свою транскрипционную репрессивную функцию в скелетных, сердечных и гладких мышцах, костях, иммунной системе, сосудистой системе и головном мозге и других. Особенностью HDACs класса IIa является то, что вместе с консервативным доменом деацетилазы они обладают регуляторным N-терминальным доменом, который обеспечивает их взаимодействие с тканеспецифичными транскрипционными факторами и ко-репрессорами (Parra and Verdin, 2010). Аминоконцевой домен содержит высоко консервативные сериновые остатки, которые подвергаются фосфорилированию. Сигналзависимое фосфорилирование HDACs класса IIa является критическим событием, которое определяет, локализованы ли они в ядре или цитоплазме и, следовательно, их способность действовать в качестве транскрипционных ко-репрессоров в ядерном компартменте (Yang and Seto, 2008).

HDAC6 и HDAC10 являются двумя членами класса IIb. HDAC6 в основном обнаруживается в цитоплазме, где его основной мишенью является

α -тубулин, и является единственным известным HDAC с двумя потенциально функциональными каталитическими доменами (Pulya et al., 2021). HDAC10 обнаружен как в ядре, так и в цитоплазме, и содержит богатый лейцином деацетилазный домен (Pojani and Barlocco, 2022).

Сиртуины — ферменты класса III — широко экспрессируются и обладают большим разнообразием выполняемых ими биологических функций, таких как регуляция окислительного стресса, репарация ДНК, регуляция обмена веществ и старение. Сиртуины локализуются в разных клеточных компартментах: SIRT1, SIRT6 и SIRT7 — в ядре, SIRT2 — в цитозоле, а SIRT3, 4 и 5 в основном обнаруживаются в митохондриях (Aventaggiato et al., 2021).

Единственный член подсемейства HDAC класса IV — HDAC11 — содержит консервативные остатки в областях каталитического ядра, которые являются общими для HDAC класса I и класса II (Nunez-Alvarez and Suelves, 2022). Функции данного представителя изучены мало, однако известно, что экспрессия HDAC11 обнаруживается в клетках тканей почек, мозга, яичках, сердца и скелетных мышц.

1.8. Гидроксамовые кислоты как ингибиторы HDAC

Известно, что при злокачественных новообразованиях наблюдается сверхэкспрессия данных ферментов, в частности, HDAC1-4, 11 (Benedetti et al., 2015, Hrabeta et al., 2014). У пациентов с болезнью Альцгеймера также выявляется чрезмерная экспрессия ферментов HDACs, в частности, HDAC6 (Zhang et al., 2012a). В связи с этим регуляции активности данных ферментов уделяется особое внимание при поиске потенциальных терапевтических средств для лечения онкологических и нейродегенеративных патологий. На рисунке 10 изображён механизм регуляции гидроксамовыми кислотами процессов, связанных с модуляцией активности гистоновых деацетилаз при развитии онкологических и нейродегенеративных патологий.

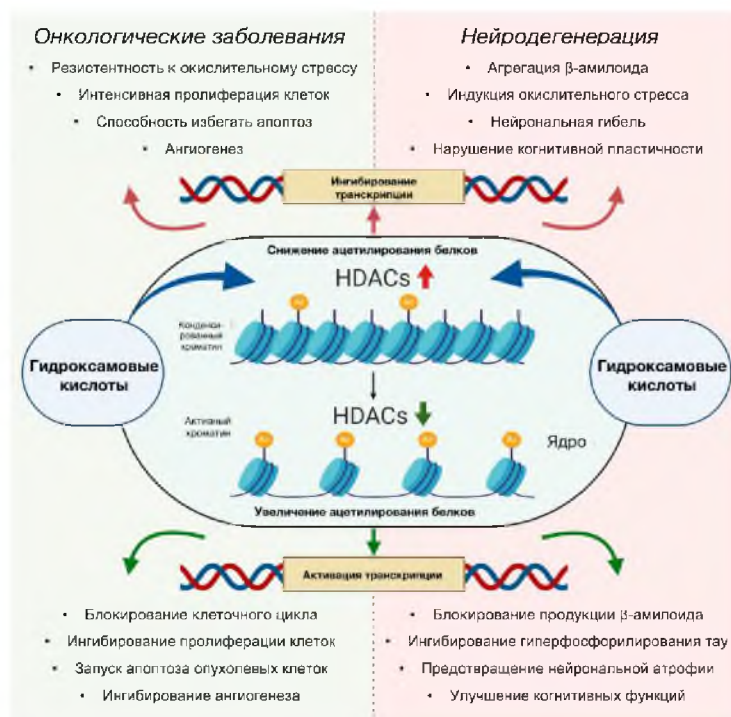


Рисунок 10 – Регуляция гидроксамовыми кислотами процессов, связанных с модуляцией активности гистоновых деацетилаз при развитии онкологических и нейродегенеративных патологий. Гидроксамовые кислоты, являясь HDACi, способны усиливать процессы ацетилирования гистоновых белков, и тем самым блокировать последствия, вызванные сверхэкспрессией данных ферментов. Так, положительными эффектами HDACi-терапии при онкологических заболеваниях является арест клеточного цикла и ингибирование пролиферации опухолевых клеток, запуск гибели по пути апоптоза и подавление процессов ангиогенеза и метастазирования. В случае нейропатологий гидроксамовые кислоты способны блокировать продукцию β -амилоида и ингибировать гиперфосфорилирование тау-белка, предотвращая атрофию нейронов, восстанавливая когнитивные функции.

На сегодняшний день существует несколько классов ингибиторов гистоновых деацетилаз. Одними из наиболее изученных и перспективных являются соединения класса гидроксамовых кислот, нацеленные, главным образом, на лечение онкологических заболеваний. Исследование их биологических свойств, а также количественный анализ взаимосвязи «структура-активность» показывает, что они обладают способностью

подавлять активность HDACs за счёт наличия функциональных групп, способных хелатировать ионы цинка (Zn^{2+}), локализованные в каталитическом центре фермента. Некоторые представители класса гидроксамовых кислот в настоящее время одобрены FDA в качестве противоопухолевых препаратов – это вориностат, белиностат и панобиностат (Carpellacci et al., 2020, Shah, 2019). Это наглядно подтверждает потенциал их использования в фармакологической коррекции заболеваний (Gupta, 2015).

Вориностат – первый ингибитор HDACs, избирательно нацеленный на HDAC1, HDAC2, HDAC3 и HDAC6, которому удалось выйти на рынок лекарственных препаратов в 2006 году (Bradner et al., 2010, Shah, 2019). Благодаря своей эффективности данный препарат быстро продвигался в доклинических и клинических исследованиях, после завершения которых получил одобрение FDA в качестве противоопухолевого средства для лечения кожной Т-клеточной лимфомы (Thurn et al., 2011). Спустя почти десять лет после утверждения вориностата в 2014 году для лечения периферической Т-клеточной лимфомы FDA был одобрен белиностат (Steele et al., 2011, Steele et al., 2008), а в 2015 году также зарегистрирован ингибитор I и II классов гистоновых деацетилаз панобиностат – препарат, предназначенный для лечения множественной миеломы (Jones et al., 2011). Несмотря на то, что данные препараты одобрены и эффективно используются в качестве противоопухолевых средств, они по-прежнему изучаются в клинических испытаниях на других видах онкологических заболеваний как в виде отдельных агентов, так и в комбинации с другими препаратами. Кроме того, активно ведётся поиск новых противоопухолевых гибридных молекул на основе гидроксамовой кислоты с целью поиска соединений, избирательно направленных на модуляцию активности той или иной HDAC для повышения эффективности действия (Thaler and Mercurio, 2014).

В исследовании Chen и коллег была разработана и синтезирована новая серия акридиновых производных гидроксамовой кислоты и проведён их

биологический скрининг. Анализ влияния данных соединений на выживаемость клеточной линии гистиоцитарной лимфомы (U937) показал наличие у них мощной антипролиферативной активности, выражающейся в наномолярных значениях величины IC_{50} . Такие цитостатические свойства гидроксамовых кислот были объяснены исследователями их эффективной ингибирующей активностью по отношению к ферментам HDAC1 и HDAC6; при этом величина IC_{50} некоторых тестируемых веществ была более чем в 2 раза ниже, чем для эталонного препарата вориностата (Chen et al., 2018). А недавно опубликованная работа Zagni и соавторов, посвящённая синтезу и исследованию биологической активности производных гидроксамовых кислот, обладающих пиразольной группой и циннамоильной группой в качестве линкера, также подтверждает противоопухолевый потенциал данного класса веществ. Так, эффективное ингибирование активности фермента гистоновая деацетилаза изученными соединениями коррелировало с их антипролиферативными свойствами на клетках нейробластомы SH-SY5Y, что выражалось в снижении пролиферации клеток дозозависимом и зависящим от времени образом (Zagni et al., 2019).

И хотя ферменты семейства гистоновых деацетилаз являются основной и наиболее изученной мишенью именно для терапии онкологических заболеваний, в последнее время прилагаются значительные усилия к поиску и разработке ингибиторов HDACs для лечения нейропатологий (Morrison et al., 2007). Поскольку известно, что нейродегенеративные заболевания сопровождаются нарушениями в регуляции транскрипции, приводящими к гибели нервных клеток, HDACs считаются весьма перспективными мишенями фармакологической коррекции нейродегенеративных заболеваний (Ricobaraza et al., 2012, Vaiserman and Pasyukova, 2012).

На сегодняшний день уже проведено немало исследований по влиянию различных соединений на HDACs с целью коррекции нейропатологий. Результаты этих испытаний показывают, что HDACi реализуют свой нейропротекторный эффект за счёт нескольких механизмов. Один из таких

механизмов – это блокирование продукции бета-амилоида (Qing et al., 2008, Ricobaraza et al., 2012), и, как следствие, ингибирование бета-амилоид-индуцированного гиперфосфорилирования тау-белка (Huang et al., 2010, Zhang et al., 2012b). Так, применение вориностата в экспериментах на 20-месячных мышах с возрастными нарушениями памяти (у пожилых мышей обнаруживается снижение уровня гистона H4K12ac в гиппокампальной области CA1) показывает, что данный препарат улучшает пространственную память. При этом применение вориностата приводит одновременно к экспрессии ацетилированных гистонов, а также стимулирует активность NMDA-рецепторов в гиппокампе (Benito et al., 2015). Подобная нейропротекторная активность была обнаружена и для пан-селективного ингибитора гистоновой деацетилазы на основе гидроксамовой кислоты панобиностата. Было обнаружено, что панобиностат проникает через гематоэнцефалический барьер, повышает уровень ацетилирования гистонов за счёт ингибирования активности HDACs и предотвращает региональную и нейрональную атрофию стриатума у трансгенных мышей линии R6/2, моделирующих болезнь Гентингтона (Chopra et al., 2016).

Ноотропный эффект представителей гидроксамовых кислот был обнаружен в экспериментах на мышах со сверхэкспрессией HDAC2. У животных с данной патологией наблюдается снижение синаптической пластичности, количества образующихся синапсов и нарушения в формировании памяти, в то время как вориностат, являясь ингибитором HDACs, может восстанавливать синаптическую пластичность и улучшать обучение и память мышей (Guan et al., 2009). В работе Steffan с соавторами для вориностата была показана эффективность на *in vivo* моделях нейродегенерации, что заключалось в способности данного соединения останавливать прогрессирующую дегенерацию нейронов при полиглутаминовых патологиях, снижая летальность дрозофил, моделирующих болезнь Гентингтона (Steffan et al., 2001). В исследованиях вориностата на мышах, экспрессирующих мутантную форму гентингина

R6/2, исследователи показывают, что вориностат также, как и упомянутый ранее панобиностат, пересекает гематоэнцефалический барьер и усиливает ацетилирование гистонов в головном мозге. Кроме того, пероральное введение вориностата трансгенным мышам резко улучшало их моторные нарушения, что делает использование данного препарата перспективным в лечении болезни Гентингтона (Hockly et al., 2003).

Известно также, в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера значительно повышен уровень белка HDAC6 в коре и гиппокампе по сравнению с мозгом здоровых людей. Ингибирование активности HDAC6 первичных кортикальных нейронов трихостатином и скриптаидом приводит к протекторному действию в отношении нейродегенерации, вызванной окислительным стрессом, а также способствует разрастанию нейритов в корковых нейронах (Rivieccio et al., 2009).

Таким образом, гидроксамовые кислоты являются перспективным классом соединений как при поиске потенциальных противоопухолевых агентов, нацеленных на белки HDACs (Yoon and Eom, 2016), так и потенциальных нейропротекторных препаратов. Несмотря на то, что на сегодняшний день использование ингибиторов HDAC доступно для фармакологической коррекции как онкологических, так и нейродегенеративных заболеваний, это всё ещё вызывает ряд проблем, которые необходимо решить. Так, большинство существующих в настоящее время ингибиторов гистоновых деацетилаз являются пан-селективными, то есть действующими против всех типов HDACs. Это вызывает массовые изменения в экспрессии генов и приводит к многочисленным побочным эффектам по причине того, что HDACs одинаково участвуют как в процессах выживания, так и гибели клеток (Yang et al., 2017). Поэтому дальнейшие исследования и поиск новых селективных ингибиторов данных ферментов, в

частности, в ряду производных гидроксамовых кислот, является перспективным и актуальным направлением при разработке потенциальных терапевтических агентов, направленных на фармакологическую коррекцию нейропатологий и онкозаболеваний.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. *In vitro* методы исследования

2.1.1. Животные

В экспериментах *in vitro* использовали беспородных нелинейных самцов-крыс массой 200-220 г. Животных содержали в соответствии со стандартными методическими рекомендациями с 12-часовым световым режимом и свободным доступом к воде и пище (в случае использования крыс для получения митохондрий печени у животных изымался корм за 24 часа до процедуры выделения). Все манипуляции с животными были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных ИФАВ РАН.

2.1.2. Приготовление гомогената мозга крыс

Для получения гомогената мозга декапитацию заранее наркотизированных CO₂ крыс проводили с помощью гильотины. Мозг гомогенизировали в буфере (120 мМ KCl, 20 мМ HEPES pH 7,4) при 4°C и центрифугировали при 1500 об/мин, после чего отбирали супернатант. Полученный гомогенат мозга крыс использовали в экспериментах в этот же день.

2.1.3. Получение митохондрий печени крыс

Митохондрии печени выделяли методом дифференциального центрифугирования. Для этого печень гомогенизировали в охлажденном буфере выделения митохондрий (225 ммоль•л⁻¹ маннитол (Диаэм, Россия), 75 ммоль•л⁻¹ сахароза (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), 10 ммоль•л⁻¹ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота (HEPES, Диаэм, Россия), 0.5 ммоль•л⁻¹ этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА, Диаэм, Россия),

0.5 ммоль•л⁻¹ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА, Диаэм, Россия), рН 7.2) с помощью гомогенизатора Поттера. Полученный гомогенат центрифугировали при 1 500 оборотов в течение 10 минут (t = 4°C). После центрифугирования липидную фазу осторожно удаляли аспирацией, а оставшийся супернатант декантировали в отдельную пробирку и центрифугировали при 10 000 оборотах в течение 10 минут (t = 4°C). Супернатант аккуратно удаляли, осадок суспендировали в буфере выделения и повторяли процедуру центрифугирования. Затем осадок ресуспендировали в небольшом объеме буфера отмывания (225 ммоль•л⁻¹ маннитол (Диаэм, Россия), 75 ммоль•л⁻¹ сахароза (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), 10 ммоль•л⁻¹ HEPES (Диаэм, Россия), 20 мкмоль•л⁻¹ ЭГТА (Диаэм, Россия), рН 7.4). Выход митохондрий составлял от 100 до 130 мг/мл белка в осадке на печень. Митохондрии хранили при 4°C в пластиковой посуде. Функциональная активность органелл сохранялась в течение 4 часов.

2.1.4. Количественное определение белка

Количественное определение белка в препаратах гомогената мозга и митохондриях печени крыс осуществлялось по стандартной методике с помощью микробиуретового метода (Matsui et al., 1983).

В ячейки глубоколоночного планшета вносили растворы гомогената мозга или митохондрий печени крыс, биуретовый реагент (Supelco[®], США), состоящий из щелочного раствора меди II, который взаимодействует с пептидными связями, в результате чего образуется продукт, регистрируемый спектрофотометрически при длине волны 540 нм, а также дезоксихолат натрия (Sigma Aldrich, Сент-Луис, США). Контрольная проба вместо образцов тканей содержала равный объем дистиллированной воды. Полученную смесь перемешивали и инкубировали при температуре 37°C в течение 15 минут для развития окраски, интенсивность которой пропорциональна содержанию белка в растворе. По истечении времени

инкубации осуществляли регистрацию окрашивания растворов в планшетах с плоским дном на анализаторе Victor 3 (Perkin Elmer) при длине волны 540 нм.

2.1.5. Определение интенсивности перекисного окисления липидов

Исследование влияния соединений на процесс перекисного окисления липидов было проведено с помощью модифицированного варианта ТБК-теста в планшетном формате (Neganova et al., 2017). В основе ТБК-теста лежит реакция 2-тиобарбитуровой кислоты с промежуточными продуктами ПОЛ, в результате которой образуется окрашенный триметиновый комплекс, главная роль при образовании которого принадлежит малоновому диальдегиду (рисунок 11).

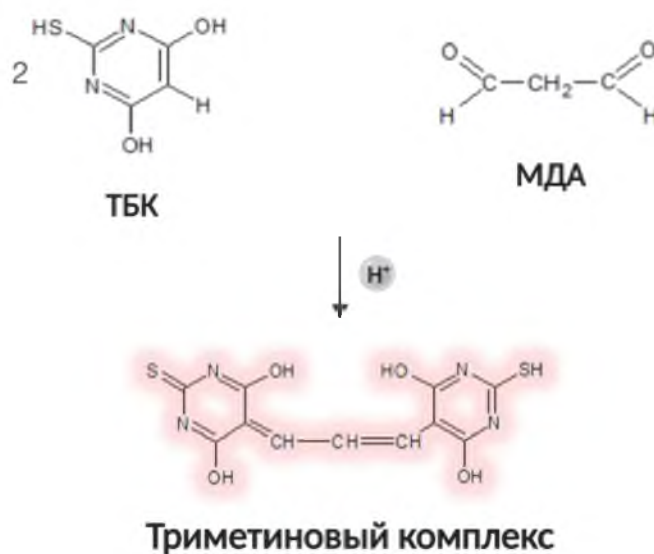


Рисунок 11 – Образование триметинового комплекса в ТБК-тесте.

В лунки глубоколоночного планшета согласно схеме эксперимента вносили: 2 мкл исследуемых соединений в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ и 250 мкл гомогената мозга крыс (2 мг/мл). Каждую концентрацию исследуемого вещества измеряли в трех параллелях.

В качестве инициаторов были добавлены в объеме 10 мкл ионы двухвалентного железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), участвующие в циклической реакции

Фентона и, как следствие, приводящие к образованию реактивных гидроксильных радикалов (Halliwell and Gutteridge, 1999), а также непосредственный источник свободных радикалов – трет-бутилгидроксипероксид (т-БГП), широко используемый в качестве стандарта при определении гидроперекисей липидов в биологических объектах. После 30-минутной инкубации при 37°C в каждую пробу добавляли 500 мкл реактива на ТБК-реактивные продукты, инкубировали 90 мин при 90°C. По истечении 90 минут образцы центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 минут и проводили измерение оптической плотности отобранного супернатанта на планшетном ридере Victor 3 (Perkin Elmer) при длине волны 540 нм. Для наиболее активных веществ высчитывали величину полумаксимального ингибирования (IC₅₀) перекисного окисления липидов.

2.1.6. Анализ антирадикальной активности

ДФПГ тест использовали для изучения антирадикальной активности соединений (Milackova et al., 2013). Данный метод основан на способности стабильного хромоген-радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) отрывать атом водорода от соединений с соответствующими группами, что сопровождается изменением максимума поглощения в электронных спектрах поглощения (и, как следствие, переходом окраски от фиолетовой к желтой, рисунок 12).

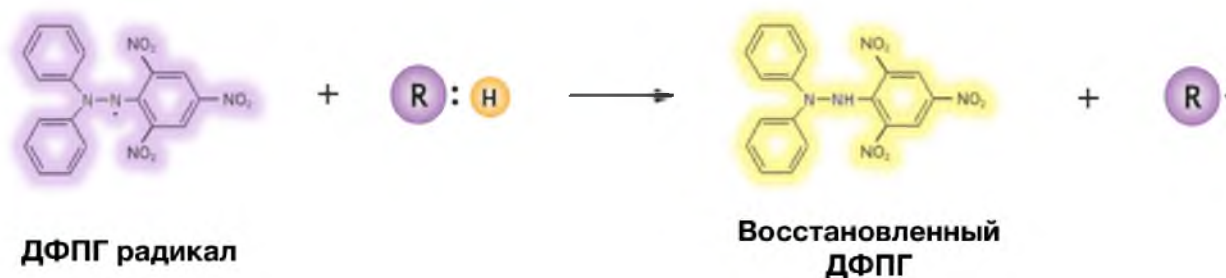


Рисунок 12 – Схема образования восстановленного ДФПГ.

Количество восстановленногоДФПГ измеряли по истечении 30 минутной инкубации с соединениями с помощью многофункционального планшетного анализатора Cytation™3 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, США) при длине волны 517 нм.

2.1.7. Изучение Fe(II)-хелатирующей способности

Определение железосвязывающей способности было проведено с использованием спектрофотометрического метода (Gulcin et al., 2006), в основе которого лежит способность потенциальных хелаторов конкурировать с феррозином за связывание с Fe(II).

Исследуемые соединения в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ вносили к этиловому спирту, после чего добавляли 50 мкМ раствора FeSO₄. Планшет встряхивали и оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 5 мин. По истечении времени во все лунки вносили 250 мкМ раствора феррозина и инкубировали 10 минут. Контрольные пробы содержали этиловый спирт, растворитель, Fe²⁺ и феррозин.

Образование комплекса железа с феррозином измеряли с помощью многофункционального планшетного анализатора Cytation™3 (BioTek Instruments, Inc., США) при длине волны 562 нм, соответствующей появлению максимума поглощения.

2.1.8. Определение активности гистоновых деацетилаз

Влияние соединений на активность ферментов гистоновых деацетилаз (HDAC1 и HDAC6) было проведено с использованием флуоресцентного метода, основанного на изучении кинетики деацетилирования субстрата в присутствии фермента (рисунок 13).

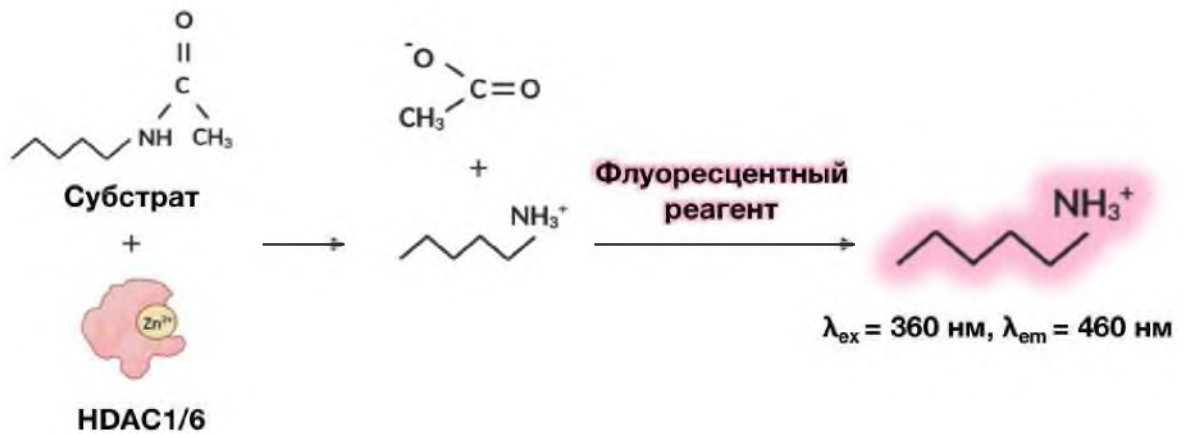


Рисунок 13 – Технология измерения активности гистоновых деацетилаз 1 (HDAC1) и 6 (HDAC6).

Для этого были использованы коммерчески доступные наборы (FLUOR DE LYS[®] HDAC1 и FLUOR DE LYS[®] HDAC6 fluorometric drug discovery assay kit, Enzo Life Sciences). Все процедуры проводили в соответствии с прилагаемым производителем протоколом. Измерение флюоресценции производили с помощью многофункционального планшетного анализатора Citation[™]3 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, США) при $\lambda_{ex} = 350-380$ нм, $\lambda_{em} = 440-460$ нм.

2.1.9. Исследование действия на трансмембранный потенциал митохондрий

Трансмембранный потенциал митохондрий печени крыс измеряли на планшетном анализаторе Victor 3 (Perkin Elmer, Германия) с использованием потенциалзависимого индикатора сафранина А (Akerman and Wikstrom, 1976) при длинах волн возбуждения 485 нм и эмиссии 590 нм. Митохондриальный препарат разводили в буфере, содержащем маннитол (225 мМ) (Dia-M, Москва, Россия), сахарозу (75 мМ) (Sigma Aldrich, Сент-Луис, США), HEPES (10 мМ) (Gibco, Шотландия, Великобритания), ЭГТА (20 мкМ) (Dia-M, Москва, Россия), КН₂РО₄ (1 мМ), pH = 7,4, из расчета 0,5 мг белка в 1 мл

среды. Сафранин А (5 мкМ) добавляли к суспензии непосредственно перед началом измерения. Через 5 мин от начала регистрации органеллы энергизировали субстратом комплекса II митохондриальной дыхательной цепи – раствором сукцината калия (5 мМ) в присутствии ингибитора комплекса I – ротенона (1 мкМ). Через 5 мин открытие митохондриальной поры индуцировали добавлением CaCl_2 (25 мкМ). Регистрацию флюоресценции производили в течение 35 минут.

2.1.10. Анализ влияния на гликолитический профиль опухолевых клеток

Изучение способности соединений подавлять аэробный гликолиз проводили с использованием анализатора клеточного метаболизма Agilent Seahorse XF96e Analyzer (Seahorse Bioscience, США) по уровню продукции протонов водорода в изучаемых образцах на клеточных линиях опухоли шейки матки HeLa и нейробластомы SH-SY5Y с помощью гликолиз стресс-теста (рисунок 14) (Zhang and Zhang, 2019). Скорость внеклеточного закисления среды измеряли в режиме реального времени, что позволило оценить интенсивность гликолиза в клетках посредством фиксирования основных параметров гликолитической функции: базального гликолиза, гликолитической ёмкости и гликолитического резерва.

Клетки HeLa и SH-SY5Y в фазе экспоненциального роста высевали в 96-луночный клеточный культуральный микропланшет Seahorse. Плотность посадки клеточной культуры составляла $2 \cdot 10^4$ /луночка. После этого проводили калибровку анализатора и, согласно протоколу, заправляли сенсорный картридж с инъекционными портами с тестовыми реагентами для оценки основных параметров гликолиза путём модулирования клеточного метаболизма, как показано на рисунке 14. Из порта А вносили исследуемые соединения в концентрации 100 мкМ. Для определения влияния тестируемых соединений на базальный гликолиз неопластических клеток из порта В добавляли 10 мМ глюкозу. Максимальную гликолитическую ёмкость

оценивали путём введения из порта С олигомицина в концентрации 1 мкМ. Разница между максимальной гликолитической емкостью и базальной скоростью позволяет получить сведения о гликолитическом резерве клеток. В качестве ингибитора данного процесса в порт D вводили 25 мМ 2-фтор-2-дезоксид-Д-глюкозу и оценивали негликолитическое подкисление.

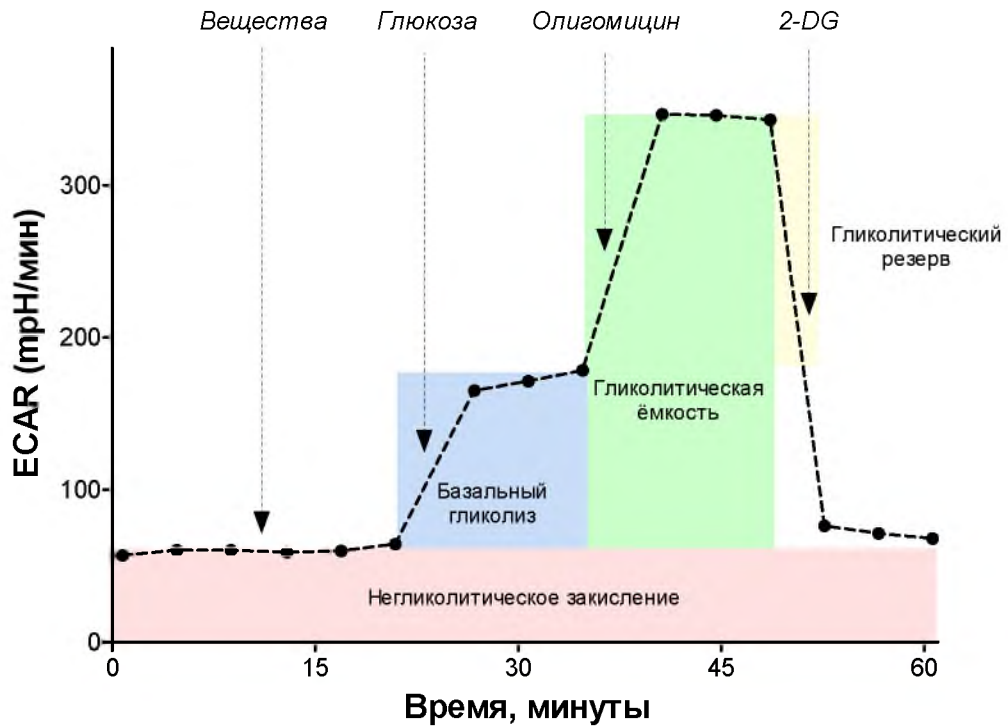


Рисунок 14 – Схема модулирования аэробного гликолиза. Уровень базального гликолиза может быть измерен при добавлении насыщающих количеств глюкозы в систему. Определение гликолитической ёмкости возможно после инъекции олигомицина, который блокирует выработку митохондриального АТФ и приводит к максимальной гликолитической способности клетки. Гликолитический резерв указывает на разницу между максимальной гликолитической емкостью и базальной скоростью. Негликолитическое закисление представляет собой внеклеточное закисление, полученное из источников, отличных от гликолиза, и может быть измерено после ингибирования гликолиза с помощью 2-фтор-2-дезоксид-Д-глюкозы (2-DG).

2.1.11. Исследование антиагрегационной активности в отношении β -амилоидного пептида

Влияние соединений на агрегацию β -амилоида (1-40 и 1-42) (Amyloid β Protein Fragment 1-40 и 1-42, Sigma Aldrich, США) анализировали по интенсивности флуоресценции Тиофлавина Т, которая коррелирует с количеством образовавшихся агрегатов (рисунок 15) (Phan et al., 2019).

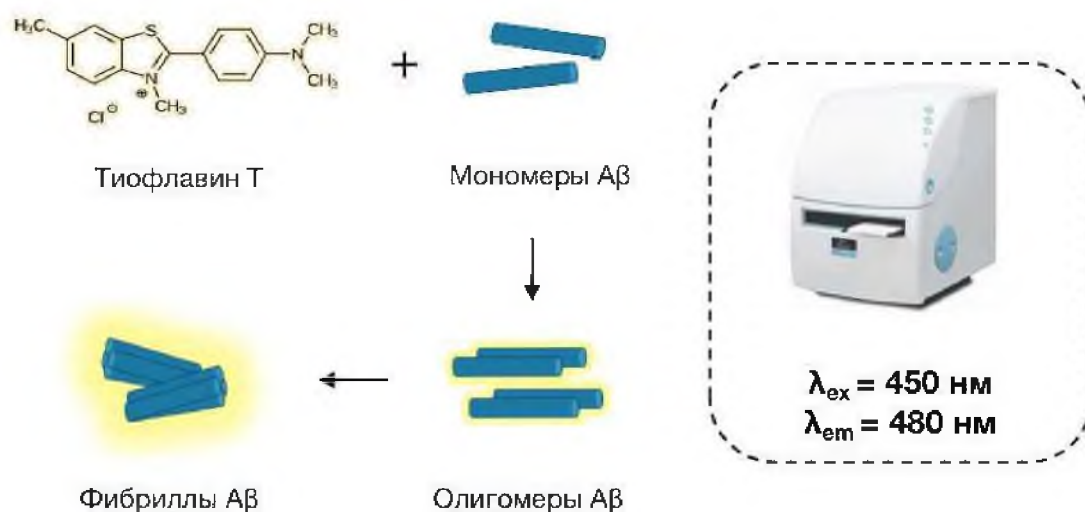


Рисунок 15 – Схематическое представление взаимодействия Тиофлавина Т с агрегатами β -амилоида.

К образцам А β добавляли 1-100 мкМ (конечная концентрация в растворе) соответствующих соединений в общем объеме 200 мкл PBS (pH = 8,0). В те же лунки вносили Тиофлавин Т (10 мкМ). Флуоресценцию измеряли в 96-луночном планшете в течение 72 ч при 37 °С на многофункциональном планшетном анализаторе Cytation™ 3 (BioTek Instruments, Inc., США) при $\lambda_{ex} = 450 \text{ нм}$, $\lambda_{em} = 480 \text{ нм}$.

2.1.12. Клеточные линии и их культивирование

Культуры клеток человека (Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия), SH-

SY5Y (нейробластома), HeLa (опухоль шейки матки), HEK-293 (эмбриональные почки человека)), предоставленные Лабораторией генетики опухолевых клеток НИИ Канцерогенеза ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина», а также ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», выращивали в питательной среде DMEM, MEM и RPMI-1640. В среду добавляли эмбриональную телячью сыворотку (10% по объёму), L-глутамин (конечная концентрация составляла 2 мМ), а в качестве антибиотика-антимикотика использовали пенициллин-стрептомицин (1% по объёму). Культивирование проводили при 37°C в увлажненной атмосфере CO₂ (5%).

2.1.13. Определение выживаемости клеток с помощью МТТ-теста

Клеточную жизнеспособность определяли по Ресазурин и МТТ-тестам (Prabst et al., 2017). Клетки опухолевых линий сеяли в 96-луночный планшет в количестве $1 \cdot 10^4$ клеток/200 мкл полной питательной среды и культивировали при 37°C в атмосфере CO₂ (5%). После 24 часов инкубации к культурам клеток добавляли различные концентрации тестируемых соединений, и далее клетки культивировали в тех же условиях в течение 24 часов. Для каждой концентрации эксперимент проводили в трех повторностях. Все вещества растворяли в ДМСО, затем разбавляли средой до необходимой концентрации. Конечное содержание ДМСО в лунке не превышало 1% и не оказывало токсического действия на клетки. В контрольные лунки добавляли растворитель в объеме 1%. По истечении времени инкубации в каждую лунку в случае суспензионных клеток добавляли ресазурин ($5 \cdot 10^{-5}$ М) или МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия, 5 мг/мл) для адгезивных культур и планшеты дополнительно инкубировали в течение 2 часов (до появления характерной окраски).

С помощью планшетного анализатора (Cytation3, БиоТек Инструментс

Инк., США) определяли флуоресценцию резорфина при длинах волн возбуждения 530 нм и эмиссии 590 нм, а оптическую плотность для формазана – при 530 нм (рисунок 16). Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование роста популяции клеток (IC_{50}), определяли на основе дозозависимых кривых.

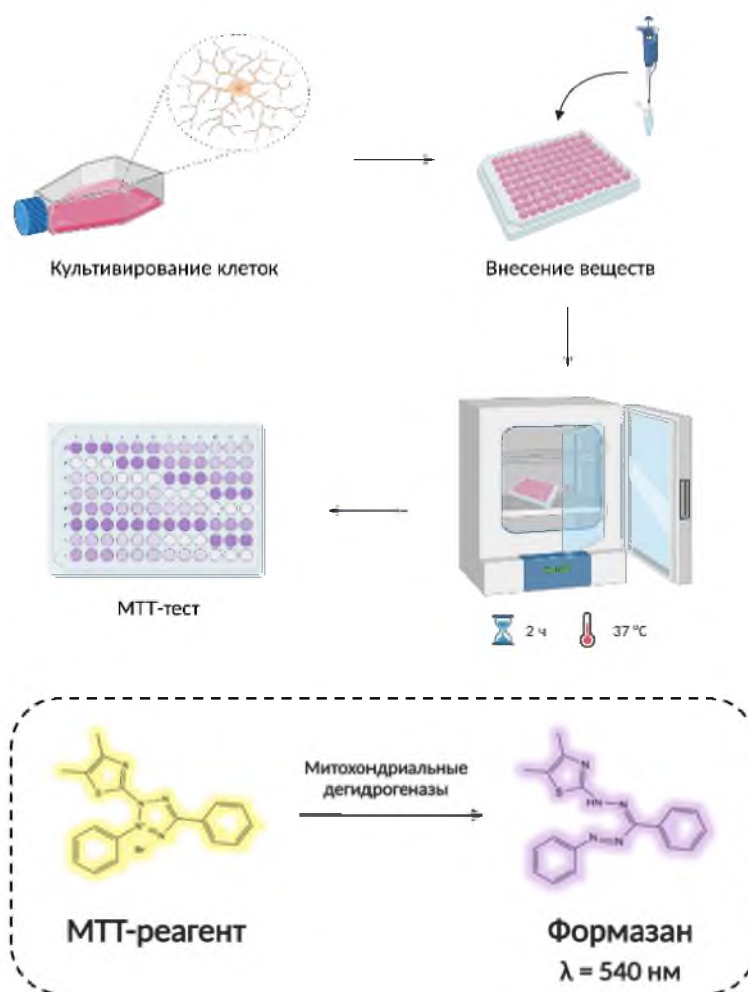


Рисунок 16 – Схематическое представление процедуры исследования влияния соединений на выживаемость клеток.

2.2. *In vivo* методы исследования

2.2.1. Животные для исследования противоопухолевого потенциала

Для изучения противоопухолевого потенциала гидроксамовой кислоты были использованы мыши линии BDF1 весом от 21 до 24 г., полученные из

УНУ Питомник и виварий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук. Животных содержали в соответствии с методическими рекомендациями по содержанию лабораторных животных в вивариях со свободным доступом к воде и пище.

2.2.2. Исследование острой токсичности

Для изучения токсикологических параметров использовали клинически здоровых животных, находившихся в одинаковых условиях содержания и кормления.

В каждую опытную группу рандомизированно распределяли по шесть особей с использованием в качестве основного критерия массу тела так, чтобы различия в данном параметре между особями не превышали 20%. Соединение вводили животным однократно внутрибрюшинно в виде водного раствора в диапазоне доз 500-900 мг/кг массы тела животного. Для учета гибели и оценки общего клинического состояния мышей наблюдения за животными проводили непрерывно в течение первых 30 мин после введения вещества, затем с интервалом 1 ч в течение 4 ч и далее ежедневно один раз в день. Общий срок наблюдения составил 14 суток.

2.2.3. Анализ хемосенсибилизирующих свойств

Исследование хемосенсибилизирующей активности проводили на модели экспериментальной перевиваемой меланомы B16 на самцах мышей-гибридов линии BDF1 весом 22-24 г ($n = 24$).

Мышей содержали в клетках со свободным доступом к воде и пище. Опухоли трансплантировали подкожно (инокулум измельченной опухолевой ткани в изотоническом растворе NaCl $5 \cdot 10^6$ клеток, $V = 0,3 \text{ см}^3$).

Противоопухолевый цитостатик циклофосфамид (в субтерапевтической дозе) и гидроксамовую кислоту вводили в виде водных растворов внутривенно. Дозы и режимы введения (сутки после трансплантации опухоли) представлены на рисунке 17.

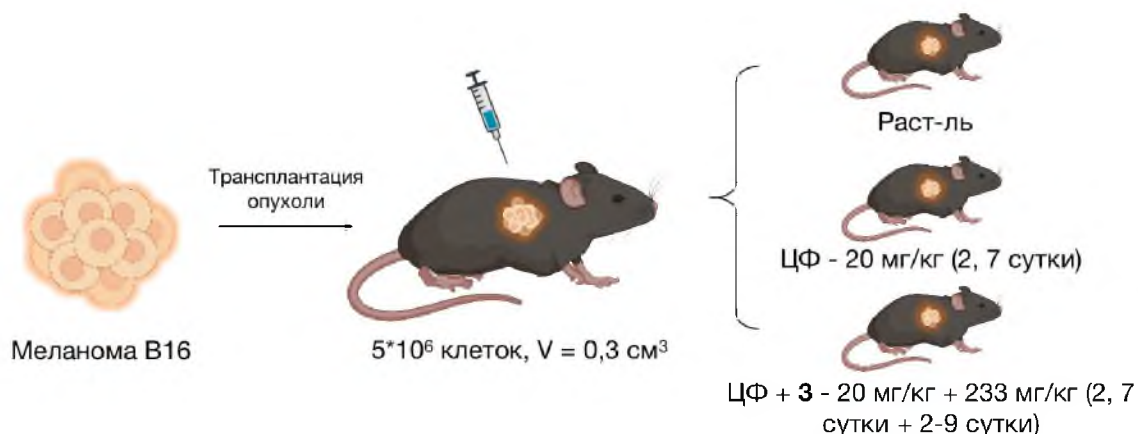


Рисунок 17 – Дозы и режимы введения ЦФ и гидроксамовой кислоты **3** на модели экспериментальной перевиваемой опухоли мышей - меланомы В16.

Отдельная группа животных-опухоленосителей, получавшая вместо инъекций препаратов растворитель, служила контролем. Каждая группа содержала восемь мышей. Наблюдение за животными проводили ежедневно в течение 24 суток.

2.2.4. Животные и экспериментальные группы при исследовании нейропротекторного потенциала

Для исследований были использованы 11-месячных мышей-самцов линий C57BL6/j и 5xFAD (Tg(APP^SwF1Lon, PSEN1^{*}M146L^{*}L286V)6799VAs/J). Животных содержали при 12/12-часовом цикле свет/темнота, при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности $50 \pm 5\%$ без ограничений в приёме воды и пищи. Все поведенческие тесты проводили в изолированной комнате в одно и то же время суток.

Путем простой алеаторизации для создания экспериментальных

процедур были сформированы 4 группы мышей (n = 8 в группе):

(1) C57Bl/6, группа мышей, которым внутрибрюшинно вводили раствор NaCl и ДМСО (10 %) - 1 мл/кг/сут (в течение 20 дней).

(2) 5xFAD, группа мышей, получавших внутрибрюшинные инъекции NaCl и ДМСО (10%) - 1 мл/кг/сут (в течение 20 дней).

(3) 5xFAD + **30**, группа мышей, получавших гидроксамовую кислоту **30** - 1 мл/кг/сут (в течение 20 дней).

(4) 5xFAD + **34**, группа мышей, получавших гидроксамовую кислоту **34** - 1 мл/кг/сут (в течение 20 дней).

Гидроксамовые кислоты **30** и **34** растворяли в физиологическом растворе и ДМСО (10%) непосредственно перед применением и вводили животным внутрибрюшинно в течение 20 дней в дозе 15 мг/кг массы тела.

2.2.5. Исследование общего поведения в тесте Открытое поле

Арена открытого поля представляла собой квадратную непрозрачную серую коробку (40 см × 40 см × 40 см), разделенную на периферийные и центральные области. Интенсивность освещения составляла 50 люкс. Во время тестирования за каждым животным наблюдали в течение 10 минут с помощью камеры, подключенной к компьютеру (рисунок 18).

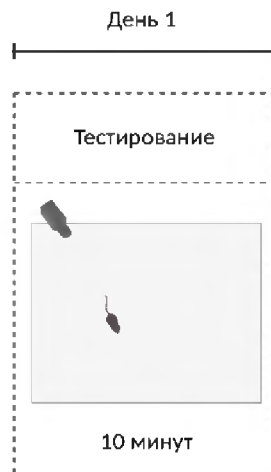


Рисунок 18 – Схема эксперимента в тесте “Открытое поле”.

Всё испытание записывали на видео и обрабатывали с помощью программного обеспечения EthoVision XT system (Noldus, Вагенинген, Нидерланды). Использование данной системы позволило оценить пути, пройденные каждой мышью, с целью анализа следующих параметров: (1) общего пройденного расстояния и (2) средней скорости движения как показателей двигательной активности мышей; времени, проведенного в (3) периферийной или (4) центральной зонах для оценки уровня тревожности.

После каждого испытания для очистки arenas открытого поля с целью удаления любых запахов от предыдущих животных использовали 70%-ный спирт.

2.2.6. Изучение эпизодической памяти в тесте Распознавание нового объекта

Тест на распознавание нового объекта позволяет оценить способность мыши запоминать, сталкивалась ли она ранее с объектом или нет (рисунок 19).

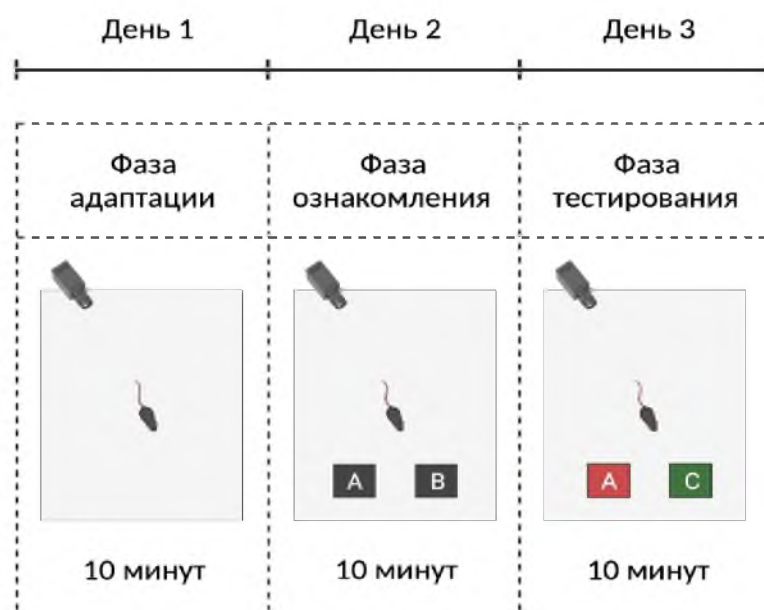


Рисунок 19 – Схема эксперимента в тесте «Распознавание нового объекта».

Та же установка, которую использовали в тесте Открытое поле, представляла собой арену для проведения данного эксперимента. Все испытания были записаны на видео и проанализированы с помощью компьютерной системы EthoVision XT (Noldus, Вагенинген, Нидерланды). Условия освещения составляли 50 лк. В первый день эксперимента мышам давали возможность акклиматизироваться к условиям экспериментальной установки, позволив им свободно исследовать окружающую среду в течение 10 минут. Спустя 24-часовой интервал во время фазы обучения мышей вновь помещали в тестовую установку на 10 минут, где находились два объекта (А и В). На следующий день при аналогичных условиях за исключением того, что один из двух объектов был заменен новым объектом (С), проводили тестирование. Об успешном формировании памяти у мышей свидетельствовал тот факт, что животное проводило больше времени за исследованием нового объекта, который она никогда не видела ранее (Lueptow, 2017). Взаимодействие с тем или иным предметом считали положительным тогда, когда нос мыши касался объекта или был направлен на объект в радиусе 1 см.

2.2.7. Анализ пространственной памяти в тесте Водный лабиринт Морриса

Тест водного лабиринта Морриса проводили на основе модифицированной парадигмы Морриса (Morris, 1984, Vorhees and Williams, 2006), что позволило оценить пространственное обучение и формирование памяти у мышей тестируемых групп.

Экспериментальная установка состояла из круглого бассейна (диаметр 150 см; высота 60 см; OpenScience, Россия), наполненного водой ($t = 22 \pm 1^\circ\text{C}$). Условия освещения были следующими: темная сторона бассейна - 50 люкс, светлая сторона - 75 люкс. Бассейн был поровну разделен на четыре

квадранта, в одном из которых была расположена платформа (диаметр 10 см), погружённая на 1 см ниже поверхности воды. Платформа и бассейн белого цвета с антибликовым покрытием в сочетании с бестеневым освещением лампы создавали эффект невидимой платформы. В качестве дистальных видимых сигналов для ориентации мышей в пространстве были использованы визуальные подсказки в виде 4 фигур (OpenScience, Москва, Россия), закрепленные на стойках и расположенные по бокам бассейна. Поведение мышей записывали с помощью видеокамеры, подключенной к системе отслеживания EthoVision XT system (Noldus, Вагенинген, Нидерланды), что в дальнейшем позволило проанализировать множество поведенческих параметров.

Тест включал в себя две фазы: фазу обучения и фазу тестирования. В течение первых четырёх дней длился период обучения (четыре испытания в день - суммарно 16 испытаний за всё время обучения). В каждом испытании мышей помещали в одно из начальных мест в случайных позициях (север, юг, восток и запад, таблица 1) носом к стенке бассейна, и давали плавать до тех пор, пока они не находили платформу. Животных, не нашедших платформу в течение 60 секунд, осторожно направляли к ней и оставляли на 30 секунд (столько же, сколько и животных, успешно обнаруживших платформу).

Таблица 1 – Схема рандомизированных стартовых позиций помещения животных в экспериментальную установку водного лабиринта Морриса во время испытаний фазы обучения

День	Попытка 1	Попытка 2	Попытка 3	Попытка 4
1	Запад	Север	Восток	Юг
2	Восток	Запад	Юг	Север
3	Юг	Восток	Север	Запад
4	Север	Юг	Запад	Восток

Через 4 дня после завершения протокола обучения со скрытой платформой на пятый день эксперимента были проведены пробные испытания для проверки успешности обучения и сохранения пространственной памяти. Во время пробного сеанса платформу убрали из бассейна, животных помещали с позиции “Запад” и мышам давали плавать в течение 90 секунд (рисунок 20). В качестве критериев эффективности было зарегистрировано время, проведенное в верном и противоположном верному квадрантах, а также количество входов в зону платформы и латентный период входа в зону платформы.

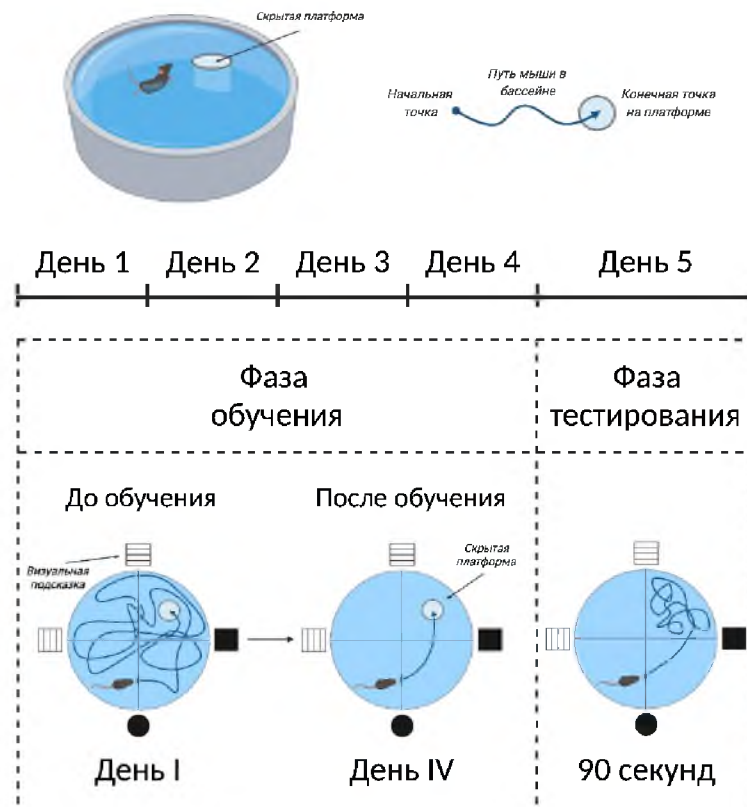


Рисунок 20 – Схема эксперимента в тесте “Водный лабиринт Морриса”.

2.3. *Ex vivo* методы исследования

2.3.1. *Получение и анализ образцов внутренних органов*

По окончании эксперимента, направленного на изучение хемосенсибилизирующей активности соединения, мышей выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков, извлекали внутренние органы, проводили взвешивание опухоли и подсчет метастазов в легких.

Антиметастатическую активность определяли по изменению индекса ингибирования метастазирования (ИИМ) по формуле:

$$\text{ИИМ (\%)} = ((A_k * B_k) - (A_o * B_o)) / (A_k * B_k) * 100,$$

где A_o и A_k – частота метастазирования в опытной и контрольной группах соответственно; B_o и B_k – среднее число метастазов в опытной и контрольной группах животных соответственно.

2.3.2. *Процедура извлечения образцов головного мозга*

По завершении серии *in vivo* экспериментов животных умерщвляли методом декапитации и производили забор образцов головного мозга для дальнейшего измерения уровня перекисного окисления липидов, содержания глутатиона в гомогенатах мозга мышей, количества амилоидных отложений и биоэнергетических характеристик.

2.3.3. *Определение содержания МДА*

Интенсивность перекисного окисления липидов гомогената мозга мышей определяли с помощью ТБК-теста, аналогично описанному выше методу (3.1.5), но без предварительной инкубации и использования инициаторов.

2.3.4. Определение содержания глутатиона

Работу глутатионовой системы собственной антиоксидантной защиты оценивали с использованием коммерчески-доступного набора (Glutathione Assay Kit, Sigma Aldrich) в соответствии с протоколом, предоставленным производителем. Уровень глутатиона определяли спектрофотометрически при длине волны 412 нм по количеству 2-нитро-5-тиобензойной кислоты - продукта, образующегося при восстановлении глутатиона (GSH) в 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойную кислоту).

2.3.5. Оценка биоэнергетических параметров митохондриальной р2 фракции

Исследование работы комплексов электрон-транспортной цепи проводили на препарате митохондриальной фракции мозга с помощью анализатора Agilent Seahorse XF96e (Seahorse Bioscience, США) посредством измерения скорости поглощения кислорода под действием модуляторов. 10 мкг митохондрий загружали на лунку планшета и добавляли 25 мкл холодного буфера для анализа митохондрий (1xMAS: 220 мМ D-маннитол, 70 мМ сахараза, 10 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgCl_2 , 2 мМ HEPES, 1 мМ ЭГТА, 0,2% бычий сывороточный альбумин, не содержащий жирных кислот, pH = 7,2). Планшет центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин при 4°C. Затем в каждую лунку добавляли 155 мкл теплого 1xMAS, содержащего 10 мМ малата и 10 мМ глутамата. Митохондриальный поток электронов оценивали путем последовательного добавления ингибитора комплекса I – ротенона (2 мкМ), субстрата комплекса II – сукцината калия (2 мкМ), ингибитора комплекса III – антимицина А и субстратов комплекса IV – аскорбат/ N,N,N',N' -тетраметил-*p*-фенилендиамин дигидрохлорид (ТМПД) (0,5 мкМ).

2.3.6. Гистология и гистохимия

Для гистологического исследования мозг мышей фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине (Leica Biosystems Inc., США) при +4°C в течение 24 часов. Затем материал обезвоживали, обезжировали и осветляли в аппарате Leica ASP200 (Leica Biosystems Inc., США) с использованием этанол-ксилоловой проводки по следующей схеме: деионизированная вода (2 часа); 70% этанол (12 часов при +4°C); этанол 96% последовательно (15 минут, 4 стадии по 10 минут); смесь этанола и ксилола 1 : 1 (30 минут); ксилол (2 стадии по 30 минут, 18 часов при +4°C); парафин (3 раза по 1 часу). Затем залитый в парафин материал обрабатывали на аппарате Leica EG1160 (Leica Biosystems Inc., США).

Парафиновые блоки вырезали на ротационном микротоме Leica RM 2265 (Leica Biosystems Inc., США) толщиной среза 8 мкм и закрепляли на стеклах Leica X-tra Adhesive (Leica Biosystems Inc., США) с полилизинном. Депарафинизацию проводили с помощью роботизированной установки Leica ST 5020 (Leica Biosystems Inc., США) по схеме: 3 раза ксилол по 10 минут, 2 раза 96% этанол по 15 минут, 75% этанол по 10 минут, затем перегоняли воду в течение 10 минут (Connor-Robson et al., 2016, Ninkina et al., 2003). После этого депарафинированные срезы подвергали гистохимическому окрашиванию для визуализации агрегатов β -амилоида.

Была использована следующая схема окрашивания: конго красный (Sigma Aldrich, США) - 5 мин, водопроводная вода - 5 мин, гемалаин Майера (гидроксид калия (Sigma Aldrich, США) в 80% этаноле (100 мл) - 5 мин, водопроводная вода - 10 мин (Stokes, 1976). Окрашенные срезы заключали под покровные стекла с помощью Immu-Mount (Thermo Shandon Ltd, Великобритания) и оценивали полученное окрашивание на лазерном сканирующем микроскопе ZEISS LSM 880 с модулем Airyscan (Carl Zeiss Vision, Германия). Получение изображения проводили при тех же настройках

с использованием функции микроскопа "tile scan". Изображения обрабатывали с помощью ImageJ 1.52 (1.8.0_172).

На изображения, содержащие только ткани головного мозга, накладывали сетку 10*10. В 10 ячейках сетки были расположены наклонно от верхнего левого угла к правому нижнему углу (Doughty, 2017), выбранные бляшки оценивали с помощью инструмента «волшебная палочка» для расчета средней площади бляшки.

Для каждого животного в каждой группе были проанализированы три изображения под микроскопом (5 дюймов), а затем усреднены.

2.4. Статистическая обработка данных

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, стандартное отклонение. Статистические сравнения проводили с использованием дисперсионного анализа (ANOVA) с поправками Даннета и Бонферрони. Анализ данных для экспериментов *ex vivo* оценивали с использованием тестов ANOVA и множественного сравнения Даннета. $p \leq 0,05$ считали статистически значимым различием между группами. Статистический анализ был выполнен с использованием GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США). В ходе экспериментов *in vivo* ни одно из животных не было исключено.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Хемотипы исследуемых гидроксамовых кислот

3.1.1. Spirocyclic hydroxamic acids based on amino acids

В отличие от N-гидроксиамидов линейных карбоновых кислот гидроксамовые кислоты циклического строения являются менее изученными. Однако существующий на сегодняшний день массив данных показывает наличие для них противоопухолевых (Goncharova et al., 2017) и антибактериальных (Li et al., 2021) свойств. Растущий интерес в получении таких соединений связан с их более высокой метаболической стабильностью благодаря наличию эндоциклической N-гидроксигруппы (Rani and Granchi, 2015).

В Отделе кинетики химических и биологических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химической физики Российской академии наук под руководством к.х.н. И.В. Выстороба в ходе направленной химической модификации был синтезирован ряд новых спироциклических гидроксамовых кислот, имеющих в своём составе один кислотный центр (остов гидроксамовой кислоты) и два основных центра (остов тетраметилзамещенного или N-метилзамещенного спиропиперидинового и имидазолидинового оснований с различными аминокислотными заместителями в α положении). Общие формулы полученных соединений представлены на рисунке 21.

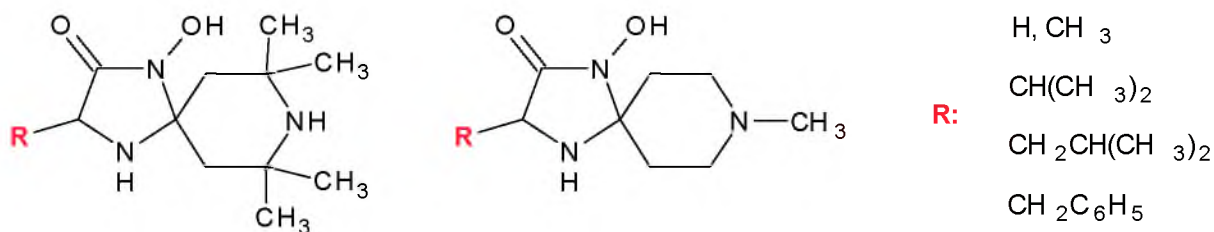


Рисунок 21 – Общие формулы спироциклических гидроксамовых кислот с аминокислотными заместителями.

3.1.2. Spirocyclic hydroxamic acids based on quinazolinone

Quinazolinone core is used as a base for many anti-tumor drugs, in particular, such as erlotinib and gefitinib (Seo, 2012). More than that, a successful introduction of the quinazolinone scaffold into a hydroxamic acid, which allowed to achieve effectiveness of HDAC inhibition with IC_{50} values in submicromolar ranges (Hieu et al., 2019).

In the Laboratory of chemical synthesis of the National Medical Research Center of Oncology named after Blokhin under the supervision of k.h.n. V.N. Osipova a series of new original derivatives of hydroxamic acids containing hydroxamate function and quinazolinone as an effective anti-tumor base, general formulas of which are presented in Figure 22.

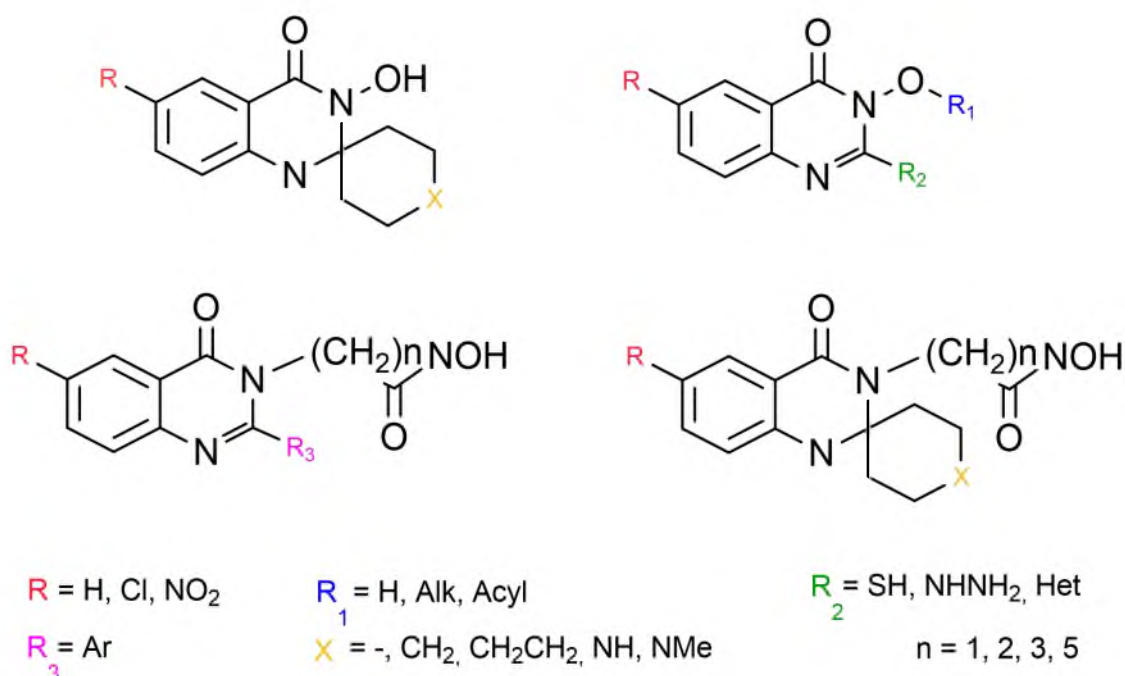


Рисунок 22 – Общие формулы спироциклических гидроksamовых кислот на основе хиназолина.

3.1.3. Гидроксамовые кислоты линейной структуры, содержащие фрагменты адамантана и природных соединений

Наиболее распространенными и перспективными направлениями разработки новых лекарственных средств на основе гидроксамомовых кислот является модификация САР-группы и линкерной области. Это позволяет добиться улучшения профиля ингибирования HDAC за счет повышения сродства к поверхностным группам ферментов и появления новых механизмов действия (Bieliauskas et al., 2016).

Для реализации данного подхода в Лаборатории направленных трансформаций природных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук под руководством к.х.н. Е.В. Сулова был получен ряд новых гидроксамовых кислот линейной структуры, содержащих фрагменты адамантана и природных соединений камфана и фенхана в качестве САР-группы, которые были объединены с линкерами различной природы с амидной группой.

Данный подход является перспективным, поскольку как адамантан, так и терпеновые соединения сами по себе продемонстрировали многообещающие фармакологические эффекты. На рисунке 23 представлены общие формулы линейных гидроксамовых кислот.

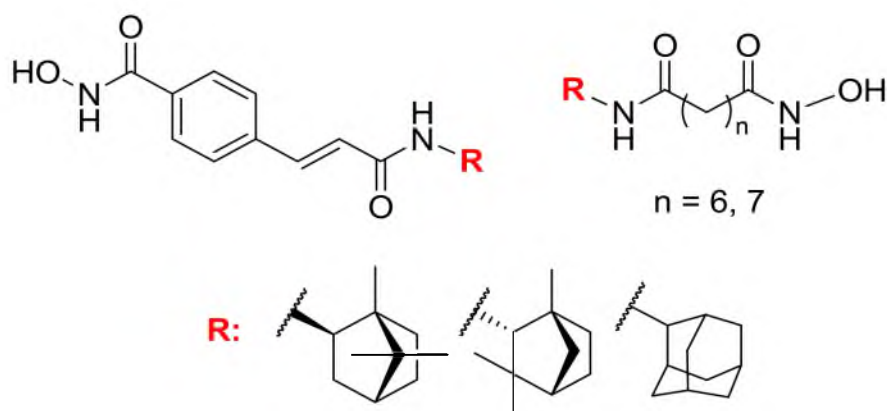


Рисунок 23 – Общие формулы гидроксамовых кислот линейной структуры.

3.2. Биологическая активность гидроксамовых кислот

3.2.1. Хемосенсибилизирующая активность спироциклических гидроксамовых кислот, содержащих аминокислоты

Исследование противоопухолевого потенциала новых спироциклических гидроксамовых кислот, содержащих в своей структуре аминокислоты, включало анализ Fe(II)-хелатирующей и HDAC1-ингибирующей способности, антиоксидантного потенциала и хемосенсибилизирующих свойств на клеточной и животной моделях (Vystorop et al., 2021).

3.2.1.1. In vitro исследование мишеней действия гидроксамовых кислот

Хорошо известно, что противоопухолевый потенциал гидроксамовых кислот в первую очередь обусловлен их способностью ингибировать различные ферменты, содержащие в своем каталитическом центре ионы металлов, что обусловило необходимость исследования хелатирующей способности новых спироциклических гидроксамовых кислот. Кроме того, соединения-хелаторы сами по себе открывают интересные перспективы в лечении онкологических заболеваний. Например, регистрируемый при злокачественных новообразованиях высокий внутриклеточный уровень железа приводит к интенсивной пролиферации опухолевых клеток за счёт избыточного усвоения неопластическими клетками данного металла (Corce et al., 2016), поэтому нейтрализация ионов железа может рассматриваться в качестве механизма действия потенциальных онколитиков.

Исследование железо-связывающей способности гидроксамовых кислот было проведено стандартным методом с использованием феррозина в

качестве хелатора ионов железа. Все исследуемые соединения обладали Fe(II)-хелатирующей способностью, при этом наиболее активными хелаторами являлись спироциклические гидроксамовые кислоты **1-5**, полученные на основе триацетонамина и содержащие в структуре тетраметил-замещенный пиперидиновый цикл (таблица 2). Процент связывания данных соединений с ионами двухвалентного железа варьировал от 74% до 92%, что согласуется с известными данными о способности соединений класса гидроксамовых кислот к хелатированию иона металла активного центра ферментов гистоновых деацетилаз и матриксных металлопротеиназ, вовлеченных в канцерогенез. Очевидно, что на уровень активности наиболее выражено влияет структура пиперидинового фрагмента циклических гидроксамовых кислот, а не заместителя в α -положении имидазолидинового цикла.

Таблица 2 – Fe(II)-хелатирующая активность спироциклических гидроксамовых кислот, содержащих аминокислоты

% Fe (II)-хелатирующей активности *			
1	74,39 ± 8,99	6	36,28 ± 1,91
2	88,74 ± 1,32	7	48,36 ± 1,12
3	73,84 ± 3,56	8	54,78 ± 3,19
4	91,92 ± 2,40	9	47,94 ± 3,57
5	90,01 ± 4,31	10	38,42 ± 7,18

Примечание: данные в таблице представлены в виде «среднее ± ОС». Отметка « — » свидетельствует об отсутствии активности у исследуемых веществ ($\leq 10\%$) в том или ином тесте. * - при действии веществ в концентрации 100 μM .

Дополнительно для спироциклических гидроксамовых кислот **1-5** были построены кривые «концентрация-эффект» и определены величины EC_{50} Fe(II)-хелатирующего эффекта (рисунок 24), которые составили для **1** - $15,41 \pm 2,72 \mu\text{M}$; **2** - $21,37 \pm 3,45 \mu\text{M}$; **3** - $13,08 \pm 0,12 \mu\text{M}$; **4** - $12,28 \pm 0,79 \mu\text{M}$ и для **5** - $16,08 \pm 1,72 \mu\text{M}$.

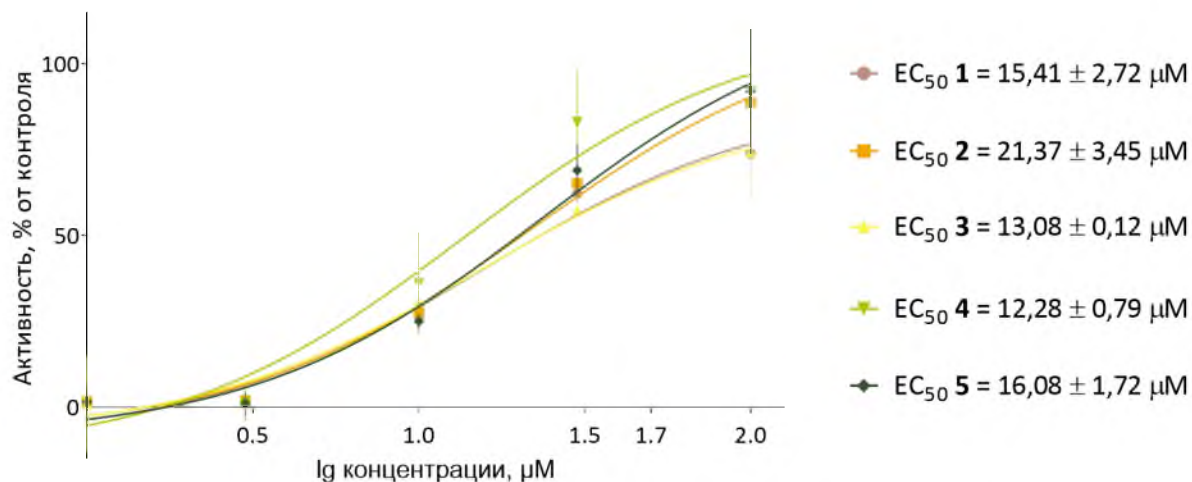


Рисунок 24 – Концентрационная зависимость Fe(II)-хелатирующего эффекта спироциклических гидроксамовых кислот на основе аминокислот в диапазоне концентраций от $3 \mu\text{M}$ до $100 \mu\text{M}$. Концентрация Fe (II) составляла $500 \mu\text{M}$.

Интересно, что исследование HDAC1 ингибирующих свойств спироциклических гидроксамовых кислот показало, что наибольшую способность подавлять ферментативную активность HDAC1 проявили именно соединения с наиболее выраженным железохелатирующим эффектом - **3-5** (рисунок 25). Очевидно, что на уровень активности наиболее эффективно влияет структура пиперидинового фрагмента гидроксамовых кислот, а не заместителя в α -положении имидазолидинового цикла. Это, вероятно, связано с тем, что для гидроксамовых кислот **6-10**, содержащих N-метилзамещенный спиропиперидиновый фрагмент, доступ к активному

центру фермента, содержащему ионы металлов, может быть пространственно затруднен ввиду более усиленной конформационной жесткости молекул.

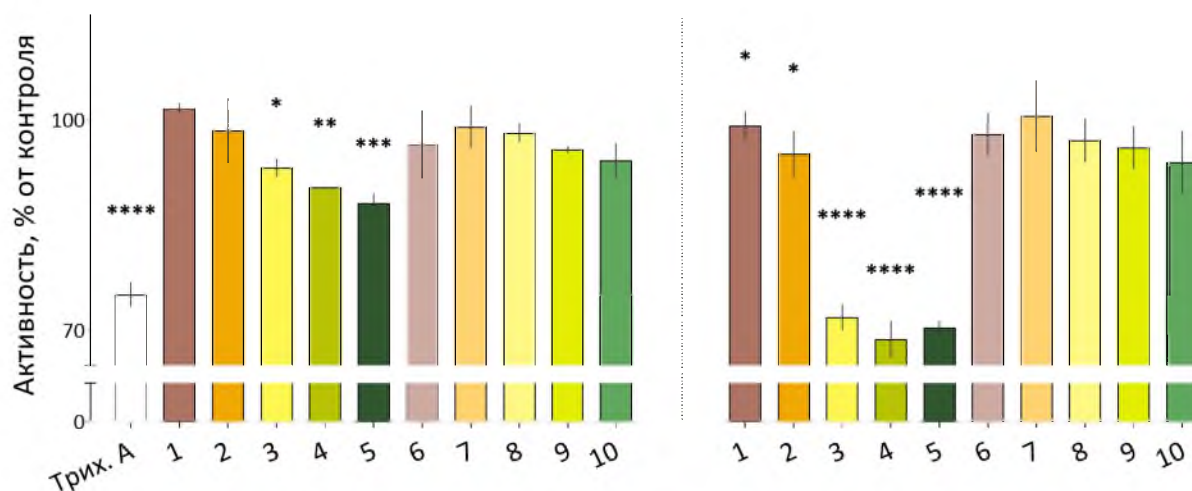


Рисунок 25 – Ингибирование HDAC1 спироциклическими гидроксамовыми кислотами на основе аминокислот **1-10** (30 μM и 100 μM) и трихостатина А (Трих. А) - 50 нМ. Данные представлены как среднее \pm CO (n = 3). $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ и **** $p < 0,0001$ по сравнению с контролем. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета.

При изучении цитотоксического профиля новых производных гидроксамовых кислот на опухолевых клетках линии HeLa, SH-SY5Y и здоровой клеточной линии Нек 293 с использованием МТТ-теста, было обнаружено, что после 24-х часовой инкубации с соединениями жизнеспособность клеток оставалась выше 90% при всех тестируемых концентрациях в диапазоне до 100 μM .

Таким образом, основываясь на полученных данных в ходе *in vitro* скрининга биологической активности спироциклических гидроксамовых кислот, целесообразным было продолжить *in vivo* исследование противоопухолевого потенциала соединений-лидеров **3-5** в контексте изучения их хемосенсибилизирующей активности, а не собственного

противоопухолевого действия. Это обусловлено тем, что отсутствие выраженной цитотоксичности рассматривается как одно из положительных свойств, характеризующих потенциальные хемосенсибилизаторы, что позволяет без усиления побочных эффектов на здоровом микроокружении добиться повышения терапевтического индекса существующих цитостатиков в отношении патологических клеток за счёт добавления нового механизма действия (Miranda et al., 2019). Кроме того, на сегодняшний день уже показано, что ингибиторы HDAC являются ценными агентами в терапии глиобластомы именно за счет повышения чувствительности опухолевых клеток к ДНК-алкилирующим химиотерапевтическим средствам благодаря открытой конформации хроматина в опухолевых клетках, что помогает обратить вспять аномальное молчание генов и приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу (Thakur et al., 2022). Так, адьювантный потенциал был продемонстрирован в ряде работ как для соединений класса гидроксамовых кислот (Chang et al., 2010, Li et al., 2021, Liao et al., 2015, Rikiishi et al., 2007), так и ингибиторов HDAC иного химического строения (Asfaha et al., 2020) в комбинации с 5-фторурацилом, цисплатином, гемцитабином и таксаном.

Для определения хемосенсибилизирующего действия гидроксамовых кислот **3-5** на клеточной модели в сочетании с цитостатиком алкилирующего действия циклофосфамидом (ЦФ) соединения в концентрации 100 μ M и ЦФ (0,1 до 100 мкM) инкубировали с клетками HeLa (карцинома шейки матки) в течение 24 часов. Полученные данные показали, что IC_{50} для циклофосфана у клеток, дополнительно обработанных гидроксамовыми кислотами **3-5**, снижалась в 1,44; 1,23 и 1,15 раза для **3**, **4** и **5** соответственно (таблица 3).

Таблица 3 – Хемосенсибилизирующая активность гидроксамовых кислот **3-5** (100 μM) в комбинации с циклофосфаном на клеточной модели HeLa

IC ₅₀ цитотоксического эффекта, μM *	
ЦФ	21,03 \pm 0,17
ЦФ + 3	14,82 \pm 0,93
ЦФ + 4	17,12 \pm 0,41
ЦФ + 5	18,24 \pm 1,90

Таким образом, наиболее выраженное повышение цитотоксической активности циклофосфамида в отношении клеток HeLa наблюдалось при добавлении гидроксамовой кислоты валинового ряда **3**. Очевидно, что с увеличением объема аминокислотного заместителя эффективность спироциклических гидроксамовых кислот снижалась. В связи с этим для *in vivo* исследования хемосенсибилизирующей активности на перевиваемой мышинной модели опухоли было выбрано соединение **3**.

3.2.1.2. *In vivo* исследование хемосенсибилизирующей активности гидроксамовых кислот

На первом этапе изучения *in vivo* противоопухолевой активности спироциклической гидроксамовой кислоты **3** был произведен анализ острой токсичности для оценки токсических эффектов, возникающих при взаимодействии соединения с организмом лабораторных животных. Для этого были использованы клинически здоровые мыши линии BDF1, для которых характерна повышенная выживаемость при проведении химиотерапевтических экспериментов. Наблюдение за животными для учета гибели и оценки общего клинического состояния проводилось после однократного введения водного раствора в течение первых 30 минут, затем – с интервалом 1 час в течение 4 часов, далее – ежедневно один раз в день в

течение 14 дней. Для расчёта терапевтической дозы гидроксамовой кислоты были определены величины ЛД₅₀ (доза, вызывающая гибель 50% животных).

Внутрибрюшинное введение гидроксамовой кислоты **3** вызывало 100% гибель животных в дозе 900 мг/кг, а значение величины ЛД₅₀ составило 750 мг/кг, что позволило отнести его к III классу опасности (умеренноопасные вещества, ГОСТ 12.1.007–76).

Исследование хемосенсибилизирующей активности спироциклической гидроксамовой кислоты, полученной на основе 1-бензилпиперид-4-она с валиновым заместителем **3**, проводили в комбинации с известными противоопухолевыми цитостатиком алкилирующего действия циклофосфамидом в низкой субтерапевтической дозе (1/10) на модели экспериментальной перевиваемой опухоли мышей - меланомы В16. Опухоль трансплантировали согласно стандартной методике подкожно (инокулум: $5 \cdot 10^6$ клеток, $V = 0,3 \text{ см}^3$). Циклофосфамид и соединение **3** вводили в виде водных растворов внутрибрюшинно. Дозы и режимы введения указаны в таблице 4.

Таблица 4 – Дозы и режимы введения циклофосфамида и гидроксамовой кислоты **3** на модели экспериментальной перевиваемой опухоли мышей - меланомы В16

Препарат	Разовая доза, мг/кг	Режим введения, сутки
Контроль	–	–
ЦФ	20	2, 7
ЦФ + 3	20 + 233	2, 7 + 2-9

В качестве критериев эффективности противоопухолевой терапии были использованы следующие показатели: среднее количество метастаз, индекс ингибирования метастазирования, средний вес и торможение роста опухоли.

Как показано на рисунке 26, при терапии циклофосфамидом было

выявлено достоверное снижение количества метастаз, а уровень индекса ингибирования метастазирования составил 38,46%. В свою очередь применение комбинированной химиотерапии цитостатика с гидроксамовой кислотой **3** привело к двукратному увеличению данного показателя (до 74,36%), что выразалось достоверном снижении количества метастаз. Подобный эффект был обнаружен и при анализе показателей, связанных непосредственно с опухолью. Так, терапия опухоли меланомы В16 низкотоксичной кислотой **3** в комбинации с циклофосфамидом позволила снизить средний вес опухоли с $9,97 \pm 1,34$ до $6,83 \pm 1,22$ ($p = 0,0002$) и достичь торможения роста опухоли животных экспериментальных групп до 31,56%, что более чем в 1,5 раза выше данного показателя при монотерапии цитостатиком (рисунок 26).

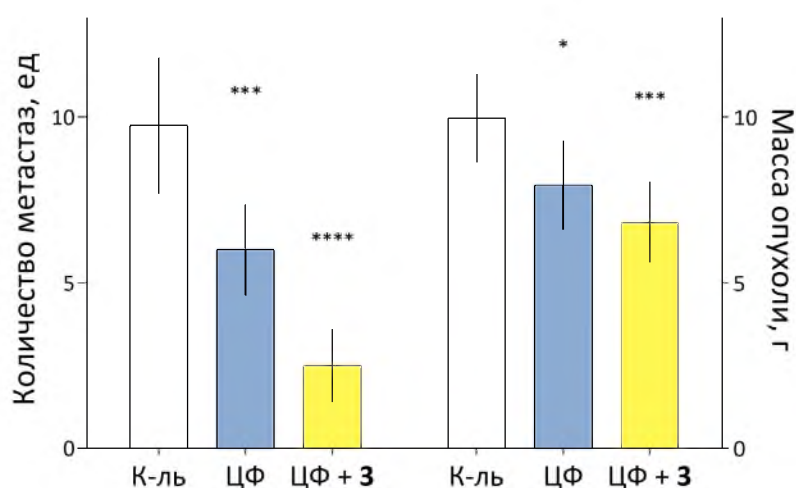


Рисунок 26 – Антиметастатический и противоопухолевый потенциал гидроксамовой кислоты валинового ряда **3** на модели меланомы В16. Данные представлены как среднее \pm СО ($n = 8$). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ и **** $p < 0,0001$ по сравнению с контролем (К-ль). Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета.

Таким образом, в ходе исследования антиметастатической и противоопухолевой активности синтезированной циклической

гидроксамовой кислоты валинового ряда **3** была обнаружена ее адьювантная способность, что выражалось в повышении чувствительности экспериментальной перевиваемой опухоли меланомы В16 к действию циклофосфида – известного цитостатика алкилирующего действия, использованного в субтерапевтической дозе, проявляя тем самым хемосенсибилизирующие свойства.

3.2.2. Противоопухолевый потенциал спироциклических гидроксамовых кислот на основе хиназолина

Для исследования противоопухолевого потенциала спироциклических гидроксамовых кислот на основе хиназолина было изучено их влияние на выживаемость клеточных линий как опухолевого, так и нормального происхождения, а также изучены возможные механизмы цитотоксического действия (Neganova et al., 2019, Neganova et al., 2020b, Neganova et al., 2021c, Климанова et al., 2020).

3.2.2.1. Влияние гидроксамовых кислот на выживаемость клеток

При анализе противоопухолевого потенциала новых синтезированных спироциклических гидроксамовых кислот были изучены их цитотоксические свойства с помощью стандартных скрининговых методов (Ресазурин и МТТ тестов) по отношению к различным линиям опухолевых клеток: Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия), SH-SY5Y (нейробластома), HeLa (опухоль шейки матки) и здоровой клеточной линии, полученной из эмбриональных почек человека (Нек 293).

Как видно из таблицы 5, при 72-х часовой инкубации клеток с большинством исследуемых веществ наблюдалось их концентрационно-зависимое токсическое действие по отношению к неопластическим клеткам.

При этом наиболее высокая цитотоксическая активность в отношении всех использованных клеток отмечалась для соединений **17-24**.

Таблица 5 – Влияние спироциклических гидроксамовых кислот на основе хиназолина на выживаемость клеток опухолевых культур Jurkat, SH-SY5Y, HeLa и здоровой линии клеток HEK 293

	IC ₅₀ цитотоксического эффекта, μM*			
	Jurkat	SH-SY5Y	HeLa	HEK 293
11	22,80 ± 0,44	> 100	> 100	> 100
12	> 100	> 100	> 100	> 100
13	> 100	> 100	> 100	> 100
14	44,28 ± 0,34	90,17 ± 1,88	> 100	> 100
15	28,34 ± 2,41	26,07 ± 0,03	> 100	> 100
16	34,88 ± 0,53	96,05 ± 1,85	> 100	> 100
17	9,77 ± 0,20	21,35 ± 0,08	30,96 ± 4,43	45,89 ± 3,17
18	11,33 ± 0,29	20,85 ± 0,05	38,15 ± 4,30	> 100
19	21,31 ± 0,20	23,72 ± 0,47	38,60 ± 2,65	> 100
20	0,98 ± 0,18	20,57 ± 0,36	48,34 ± 1,20	> 100
21	6,21 ± 0,03	22,67 ± 1,57	8,60 ± 1,15	> 100
22	22,55 ± 0,17	56,78 ± 1,39	> 100	> 100
23	9,92 ± 0,18	24,84 ± 0,31	> 100	46,87 ± 1,44
24	0,86 ± 0,21	34,38 ± 2,38	18,07 ± 2,67	> 100
25	12,24 ± 1,76	> 100	> 100	22,44 ± 0,15

Примечание: данные представлены в виде значений IC₅₀ (μM) цитотоксического эффекта: как среднее ± СО по отношению к значениям контроля (ДМСО ≤ 1%), принятого за 100%.

Это, вероятно, может быть связано с наличием в структуре данных веществ атомов хлора и вызывает интерес в их дальнейшем исследовании с целью установления возможных механизмов противоопухолевой активности.

Интересно, что для синтезированных соединений был обнаружен сниженный токсический эффект или полное его отсутствие в максимальной концентрации на нетрансформированных эмбриональных клетках почки человека НЕК 293, что очевидно позволяет предположить селективность действия спироциклических гидроксамовых кислот именно в отношении клеток опухолевого происхождения.

3.2.2.2. Способность гидроксамовых кислот модулировать процессы, связанные с окислительным стрессом

При установлении возможных механизмов цитотоксического действия гидроксамовых кислот **17-24** была исследована их способность модулировать процессы, связанные с окислительным стрессом. Было обнаружено, что большинство соединений эффективно ингибировали процесс перекисного окисления липидов гомогената мозга крыс (таблица 6). При этом наибольший процент подавления данного процесса отмечался при иницировании ПОЛ ионами двухвалентного железа (7 из 8 соединений снижали содержание малонового диальдегида в системе более чем на 50%), в то время как при использовании в качестве индуктора трет-бутилгидроксипероксида данные вещества также проявляли антиокислительные свойства, но в меньшей степени. Это позволило предположить, что антиоксидантный потенциал спироциклических гидроксамовых кислот может быть связан с их способностью как образовывать координационные связи с ионами железа, так и связывать свободные радикалы, нейтрализуя их активность. Однако при исследовании Fe(II)-хелатирующих свойств наблюдалась незначительная способность данных веществ связывать ионы двухвалентного железа. Напротив, в ДФПГ-тесте соединения проявили антирадикальную активность

(таблица 6), что очевидно, говорит о том, что механизм их антиоксидантного действия скорее всего связан с прямым влиянием на свободные радикалы за счет наличия в структуре гидроксаматной функции.

Для гидроксамовых кислот **18**, **19**, **20**, **22** и **24** с выраженной способностью подавлять ПОЛ, была исследована концентрационная зависимость ингибирования процесса и рассчитаны величины IC_{50} (таблица 6).

Таблица 6 – Данные исследования антиоксидантного статуса спироциклических гидроксамовых кислот на основе хиназолина

	% активности *			
	Ингибирование ПОЛ		Хелатир. Fe(II)	Антирадик. активность
	т-БГП	Fe(II)		
17	89,20 ± 9,39	39,13 ± 4,35	14,00 ± 1,60	24,99 ± 5,20
18	88,56 ± 0,85	52,90 ± 8,23	-	24,78 ± 1,26
19	81,60 ± 2,76	60,14 ± 2,51	12,30 ± 3,48	21,90 ± 1,87
20	80,95 ± 2,16	56,02 ± 3,21	-	18,56 ± 0,42
21	38,39 ± 4,16	44,93 ± 2,51	-	20,49 ± 0,18
22	55,01 ± 2,22	75,46 ± 0,80	10,24 ± 0,49	33,46 ± 2,49
23	67,02 ± 0,43	45,65 ± 3,77	14,95 ± 1,86	34,98 ± 0,09
24	67,61 ± 1,86	67,59 ± 2,12	-	23,89 ± 1,96

Примечание: данные в таблице представлены в виде «среднее ± ОС». Отметка « — » свидетельствует об отсутствии активности у исследуемых веществ ($\leq 10\%$) в том или ином тесте. * - при действии веществ в концентрации 100 μ M.

Для спироциклических гидроксамовых кислот **18**, **19**, **20**, **22** и **24**, обладающих выраженной способностью подавлять перекисное окисление

липидов, инициируемое как ионами двухвалентного железа, так и непосредственным источником свободных радикалов – трет-бутилгидроксипероксидом, была исследована концентрационная зависимость ингибирования данного процесса и рассчитаны величины полумаксимального ингибирования IC_{50} (рисунок 27).

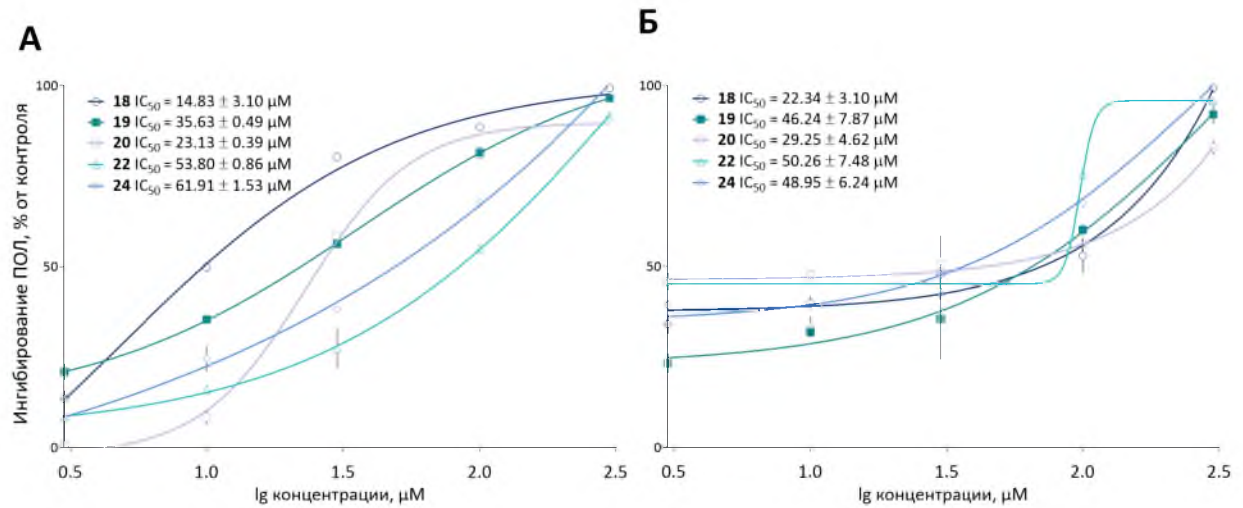


Рисунок 27 – Концентрационная зависимость ингибирования процесса перекисного окисления липидов гомогената мозга крыс, инициированного ионами Fe(II) – А и т-БГП – Б, под действием исследуемых соединений в диапазоне концентраций от 3 μM до 300 μM . Концентрация ионов Fe(II) составляла 500 μM , т-БГП – 1,6 мМ.

Такая способность соединений **18**, **19**, **20**, **22** и **24** модулировать окислительные процессы в клетке может являться одним из возможных механизмов противоопухолевого действия в отношении неопластических клеток, и способствовать снижению их токсического действия на здоровые клетки организма, что коррелирует с результатами, полученными при изучении цитотоксического профиля данных веществ.

3.2.2.3. Влияние гидроксамовых кислот на трансмембранный потенциал митохондрий

Вклад в противоопухолевую активность соединений может вносить способность оказывать влияние на функциональные характеристики митохондрий. При изучении влияния спироциклических гидроксамовых кислот на мембранный потенциал митохондрий было обнаружено, что добавление соединений с шифром **18**, **20**, **21** и **22** в рабочей концентрации 100 μM к суспензии энергизованных субстратами I и II комплексов дыхательной цепи митохондрий оказывало деполяризирующее действие на митохондриальную мембрану, что сопровождалось усилением сигнала флуоресценции (рисунок 28).

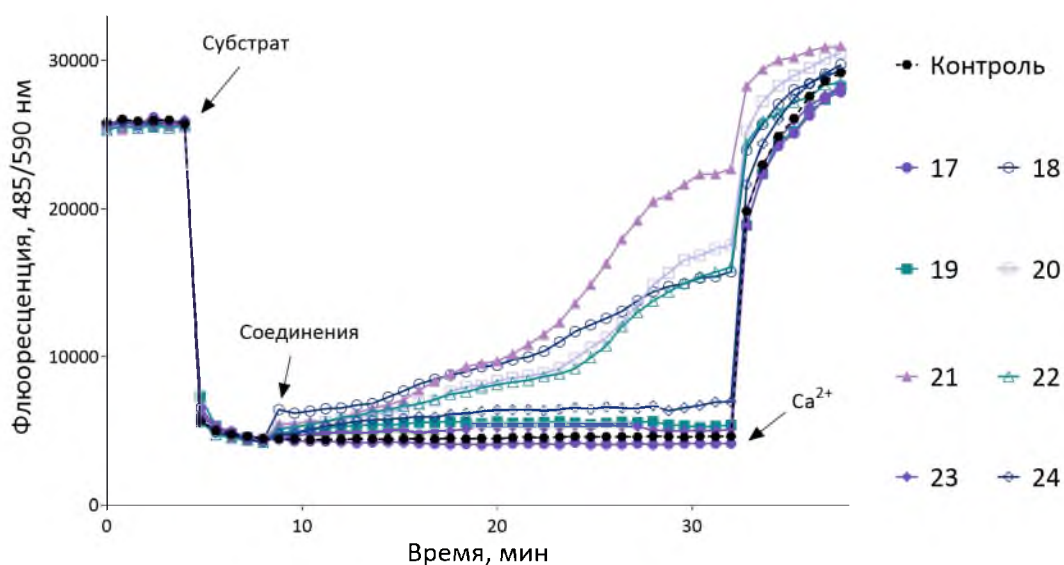


Рисунок 28 – Влияние спироциклических гидроксамовых кислот на основе хиназолина на мембранный потенциал митохондрий печени крыс (0,5 мг/мл). Концентрация исследуемых веществ составляла 100 μM , ионов Ca^{2+} – 25 μM . Энергизацию митохондрий проводили глутаматом (5 мМ), малатом (5 мМ), сукцинатом калия (5 мМ). Данные представлены в виде кинетических кривых изменения мембранного потенциала митохондрий при $\lambda_{\text{ex}} = 458$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 590$ нм.

Кроме того, была обнаружена концентрационная зависимость влияния этих соединений на процесс деполяризации, усиливающейся во времени (рисунок 30). Очевидно, модуляция функций митохондрий в клетке спироциклическими гидроксамовыми кислотами **18** (рисунок 29 А), **20** (рисунок 29 Б), **21** (рисунок 29 В) и **22** (рисунок 29 Г) позволяет предположить для них наличие возможного проапоптотического механизма противоопухолевого действия.

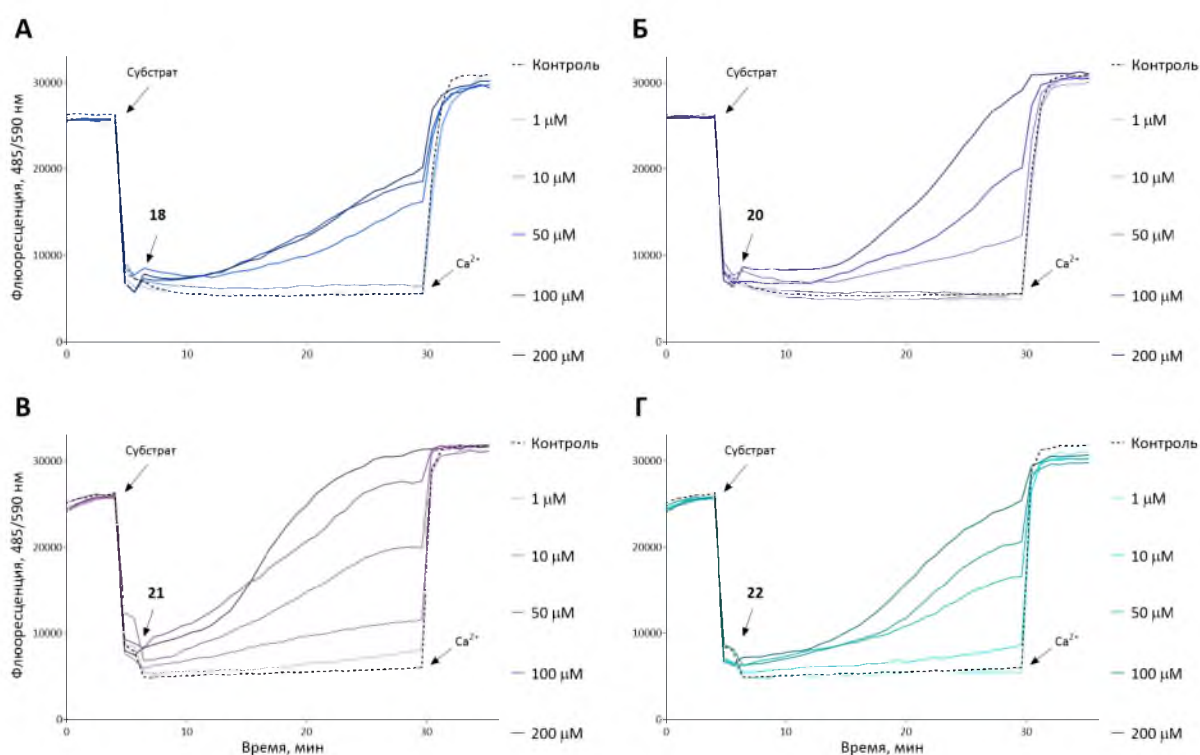


Рисунок 29 – Влияние соединений **18** (А), **20** (Б), **21** (В) и **22** (Г) в диапазоне концентраций от 1 μМ до 200 μМ на мембранный потенциал митохондрий печени крыс (0,5 мг/мл). Концентрация ионов Ca²⁺ составляла 25 μМ. Энергизацию митохондрий проводили глутаматом (5 мМ), малатом (5 мМ), сукцинатом калия (5 мМ). Данные представлены в виде кинетических кривых изменения мембранного потенциала митохондрий при $\lambda_{cx} = 458$ нм, $\lambda_{cm} = 590$ нм.

3.2.2.4. Ингибирование ферментативной активности HDAC1
гидроксамовыми кислотами

При изучении возможного влияния гидроксамовых кислот на эпигенетическую регуляцию в клетке для гидроксамовых кислот **17-22** наблюдалось достоверное снижение активности фермента гистоновая деацетилаза 1, при этом наибольшую HDAC1-ингибирующую способность проявляли соединения **19** и **22**, что может быть связано с наличием двух атомов хлора в их структуре (рисунок 30).

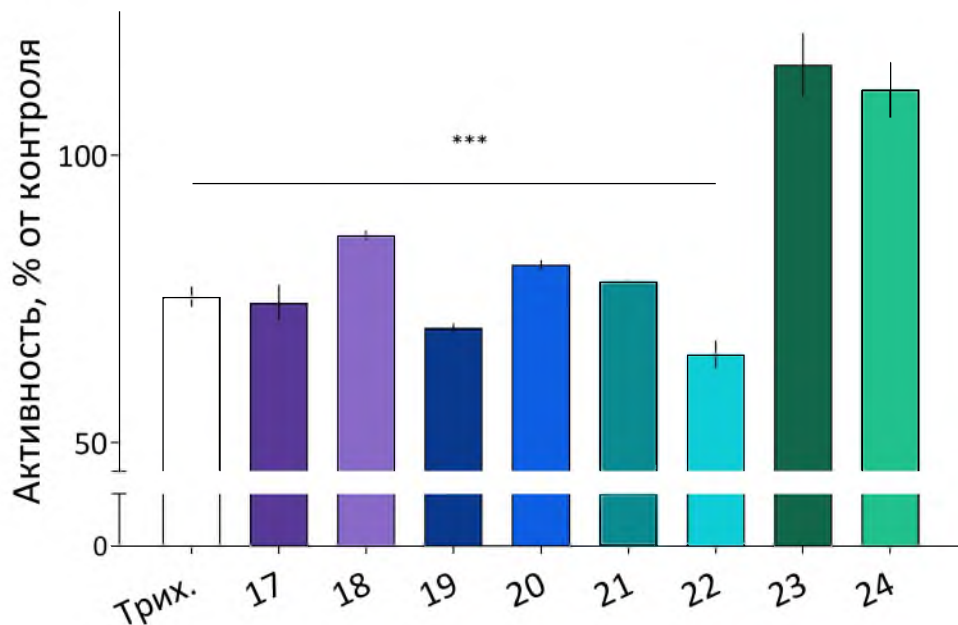


Рисунок 30 – Влияние спироциклических гидроксамовых кислот на основе хиназолина на активность фермента HDAC1. Концентрация исследуемых веществ составляла 100 μ M, Трихостатина (Трих.) – 50 нМ. Данные представлены в виде % активности: как среднее \pm ОС по отношению к значениям контроля (непосредственно активность HDAC), принятого за 100%. ***, $p < 0,001$ по сравнению с контролем. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета.

3.2.2.5. Модуляция гидроксамовыми кислотами гликолитических функций опухолевых клеток

Влияние исследуемых соединений на гликолиз клеток опухолевой культуры рака шейки матки человека HeLa, как основного энергетического состояния неопластических клеток показало, проводили с помощью анализатора клеточного метаболизма Agilent Seahorse XF96e (Seahorse Bioscience, США) путем измерения уровня продукции протонов в режиме реального времени. Как показано на рисунке 31, соединения **17** и **22** приводили к значительному снижению скорости внеклеточного подкисления при добавлении насыщающих количеств глюкозы в систему и тем самым подавляли базальный гликолиз.

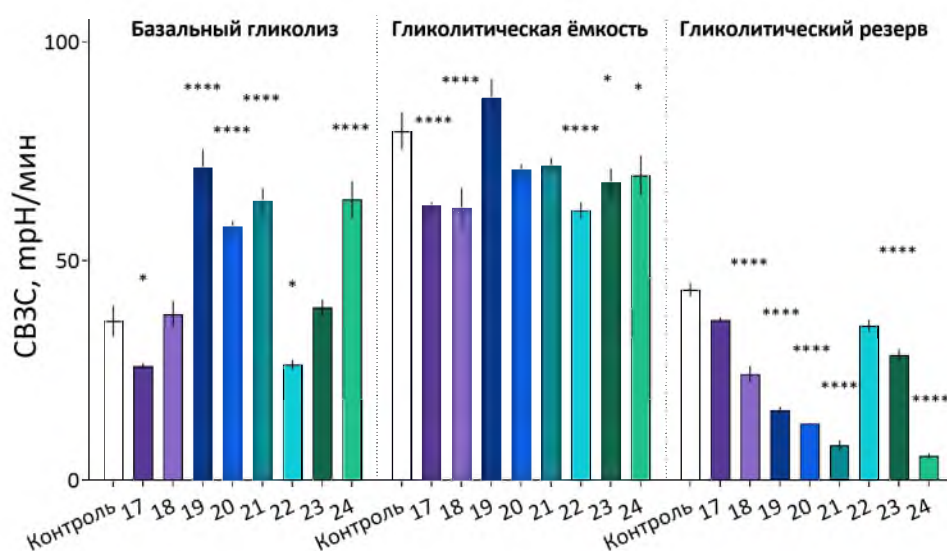


Рисунок 31 – Влияние спироциклических гидроксамовых кислот на основе хиназолина на гликолитический профиль клеток HeLa. Скорость внеклеточного закисления среды (СВЗС) является индикатором гликолиза и показывает степень закисления внеклеточной среды. Концентрация исследуемых веществ составляла 100 μM , глюкозы – 10 мМ, олигомицина – 1 μM , 2-фтор-2-дезоксид-D-глюкозы – 25 мМ. *, $p < 0,05$ по сравнению с контролем. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета.

При введении олигомицина, блокирующего выработку митохондриального АТФ и приводящего к максимальной гликолитической способности клеток, в контрольной группе отмечалось значительное закисление среды, что свидетельствовало об интенсивном гликолизе и высвобождении молочной кислоты. В свою очередь для гидроксамовых кислот **17, 18, 22-24** отмечалось ингибирование гликолитической ёмкости, что очевидно связано с подавлением данными веществами продукции лактата. Подавление такого параметра гликолитической функции как гликолитический резерв было обнаружено для большинства синтезированных соединений.

Подобный эффект наблюдался и при оценке гликолитического профиля на клетках нейробластомы человека SH-SY5Y (рисунок 32).

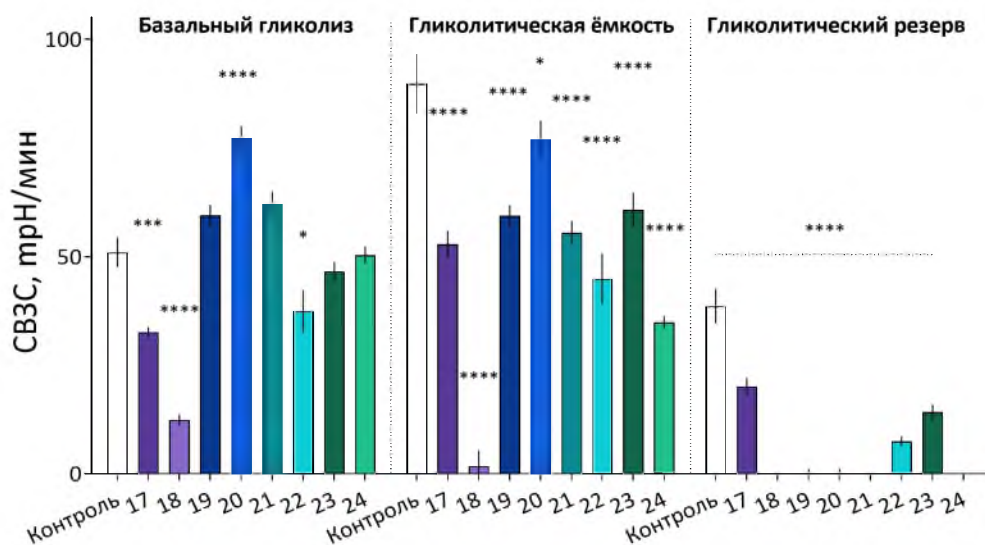


Рисунок 32 – Влияние спироциклических гидроксамовых кислот на основе хиназолина на гликолитический профиль клеток SH-SY5Y. Скорость внеклеточного закисления среды (СВЗС) является индикатором гликолиза и показывает степень закисления внеклеточной среды. Концентрация исследуемых веществ составляла 100 μM , глюкозы – 10 mM , олигомицина – 1 μM , 2-фтор-2-дезоксид- D -глюкозы – 25 mM . *, $p < 0,05$ по сравнению с контролем. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета.

Достоверное подавление интенсивности базального гликолиза в сравнении с контрольной группой отмечалось для соединений **17**, **18** и **22**. Кроме того, большинство исследуемых веществ эффективно снижали гликолитическую ёмкость и гликолитический резерв. Такое угнетение гликолиза, гликолитической ёмкости и уменьшение гликолитического резерва клеток опухолевых линий HeLa и SH-SY5Y исследуемыми соединениями может свидетельствовать об их возможном регулировании данного процесса в неопластических клетках в сторону окислительного фосфорилирования и являться одним из механизмов цитотоксической активности, показанной ранее. Такое угнетение параметров гликолиза синтезированными гидроксамовыми кислотами может являться важным механизмом их цитотоксической активности.

Таким образом, по совокупности действия на ключевые мишени канцерогенеза гидроксамовых кислот на основе хиназолина были рекомендованы к дальнейшим испытаниям в качестве потенциальных мультитаргетных антинеопластических агентов. На сегодняшний день продолжаются работы по исследованию противоопухолевого потенциала гидроксамовых кислот в серии экспериментов *in vivo*.

3.2.3. Нейропротекторные свойства гидроксамовых кислот, содержащих фрагменты адамантана и природных соединений

Для изучения нейропротекторной активности синтезированных гидроксамовых кислот с CAP-группой природного происхождения были использованы методы *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*, включающие определение антиоксидантного статуса соединений, влияние на активность HDAC6 и агрегацию β -амилоида, анализ влияния на выживаемость клеточных культур, а также определение влияния на когнитивные функции трансгенных животных линии 5xFAD с последующим исследованием действия на

процессы, связанные с окислительным стрессом и митохондриальной дисфункцией, в образцах мозга *post mortem* (Neganova et al., 2021a).

3.2.3.1. In vitro исследование нейропротекторного потенциала гидроксамовых кислот

Основной мишенью действия свободных радикалов, сверхпродукция которых наблюдается при болезни Альцгеймера, являются липиды как клеточных мембран, так и мембран органелл. Поэтому важными свойствами для потенциальных нейропротекторов являются как наличие прямой антирадикальной активности для нейтрализации АФК, так и способность ингибировать процесс перекисного окисления липидов.

В качестве модельной системы для изучения антиоксидантной активности гидроксамовых кислот был использован препарат гомогената мозга крыс, содержащий фрагменты клеточных мембран. Для инициирования процесса перекисного окисления липидов использовали ионы двухвалентного железа для запуска реакции Фентона и трет-бутилгидроксипероксид (т-БГП) как прямой источник свободных радикалов. Как показано в таблице 7, большинство гидроксамовых кислот проявило умеренную антиоксидантную активность, при этом для соединений **30** и **34** наблюдалась наиболее выраженная способность ингибировать т-БГП-индуцированное ПОЛ: на $43,24 \pm 1,28\%$ и $44,59 \pm 1,73\%$, соответственно. При оценке антирадикальной активности соединений с помощьюДФПГ-теста было обнаружено, что наиболее выраженными антирадикальными свойствами обладает гидроксамовая кислота **34**, о чём свидетельствует процент активности на уровне $43,34 \pm 1,42 \%$ (таблица 7).

По-видимому, наличие антиоксидантных свойств для синтезированных гидроксамовых кислот может быть связано с включением в состав САР-группы фрагментов адамантана, фенхана и камфана. Из литературных данных известно наличие антиоксидантной активности для ряда

производных адамантана (Marotta et al., 2020). Так, для производного адамантана – мемантина – в литературе описана способность уменьшать окислительное повреждение в коре и гиппокампе мозга крыс – двух важных областях мозга, участвующих в формировании памяти.

Таблица 7 – Антиоксидантный статус и HDAC6-ингибирующая способность гидроксамовых кислот линейной структуры с CAP-группой природного происхождения

	% активности *			
	Ингибирование ПОЛ		Антирадикальная активность	Ингибирование HDAC6
	т-БГП	Fe (II)		
26	35,96 ± 1,99	28,39 ± 7,41	22,22 ± 1,40	99,34 ± 0,67
27	30,36 ± 1,98	44,02 ± 1,57	-	86,39 ± 0,46
28	24,02 ± 3,44	28,90 ± 3,38	-	91,06 ± 0,35
29	22,62 ± 4,31	37,91 ± 1,08	-	99,49 ± 0,48
30	43,24 ± 1,28	21,52 ± 2,15	19,70 ± 1,34	98,04 ± 0,06
31	16,27 ± 0,42	26,41 ± 2,58	-	98,62 ± 1,88
32	18,26 ± 4,90	32,91 ± 1,12	20,14 ± 1,28	99,14 ± 0,97
33	20,63 ± 3,92	34,16 ± 1,37	20,32 ± 0,41	95,06 ± 1,19
34	44,59 ± 1,73	19,81 ± 4,83	43,34 ± 1,42	87,90 ± 0,22

Примечание: данные в таблице представлены в виде «среднее ± ОС». Отметка «—» свидетельствует об отсутствии активности у исследуемых веществ ($\leq 10\%$) в том или ином тесте. * - при действии веществ в концентрации 100 μM .

Хорошо известно, что болезнь Альцгеймера характеризуется повышенной активностью и сверхэкспрессией гистоновой деацетилазы 6 (HDAC6), что сопровождается нарушениями в регуляции транскрипции и

коррелирует с аккумуляцией β -амилоида, гиперфосфорилированием тау-белка и дегенерацией нейронов (Zhang et al., 2021).

Для всех гидроксамовых кислот с САР-группой природного происхождения была обнаружена ингибирующая способность по отношению к HDAC6 (таблица 7).

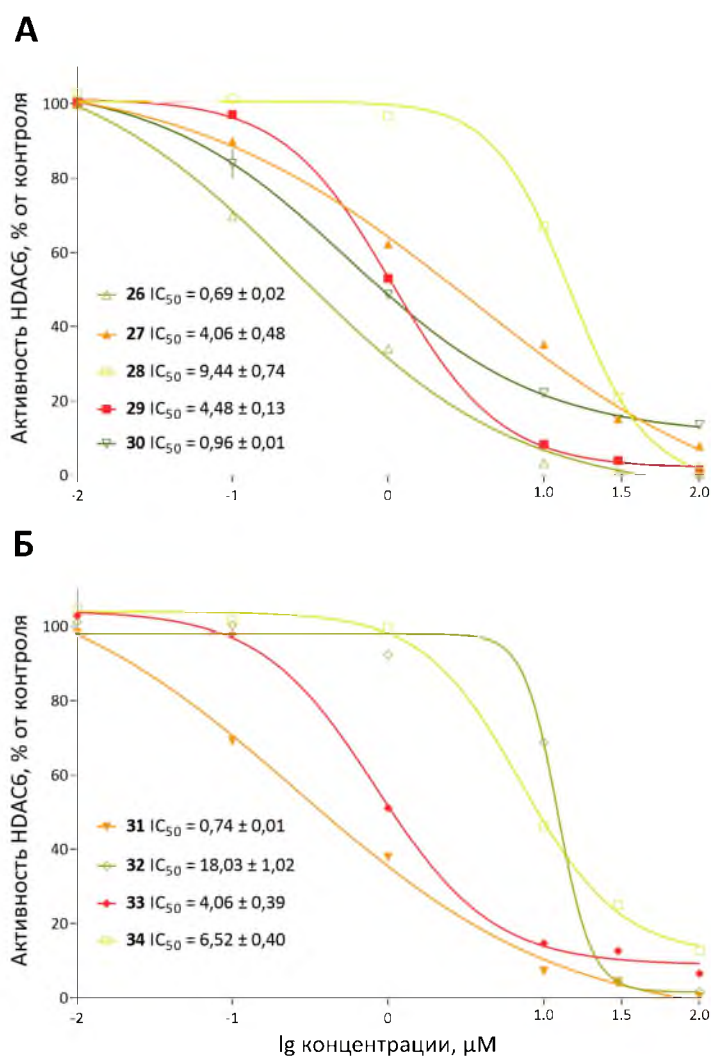


Рисунок 33 – Концентрационная зависимость ингибирования гистоновой деацетилазы 6 под действием гидроксамовых кислот **26-30** - А и **31-34** - Б линейной структуры с САР-группой природного происхождения в диапазоне концентраций от 0,01 μM до 100 μM .

Было показано, что наибольшую ингибирующую способность по отношению к HDAC6 проявляли соединения **26**, **30** и **31** с линейной

углеводородной структурой линкера и содержащие в CAP-группе каркасные фрагменты адамантана и камфана. Значения величины IC_{50} HDAC-ингибирующего эффекта данных гидроксамовых кислот находились в наномолярном диапазоне: $0,69 \pm 0,02 \mu\text{M}$; $0,96 \pm 0,01 \mu\text{M}$ и $0,74 \pm 0,01 \mu\text{M}$, соответственно. Также высокая активность наблюдалась для соединений **27**, **29**, **33** и **34**, о чем свидетельствовали IC_{50} , не превышающие $6,5 \mu\text{M}$ (рисунок 33 А и Б).

Таким образом, можно предположить, что основной вклад в HDAC6-ингибирующую способность синтезированных гидроксамовых кислот вносит природа линкера, способствующего проникновению цинк-связывающего фрагмента вещества в каталитический центр фермента (Neganova et al., 2022) и тем самым его ингибирования. Очевидно, что наилучшим действием характеризуются соединения с гекса- и гептаметиленовым линкером, имеющие типичное для ингибиторов HDAC6 строение: CAP-linker-ZBD.

Целый ряд различных по клинической картине нейродегенеративных заболеваний имеет сходный молекулярный механизм патогенеза, в основе которого лежит патологическая агрегация белков, приводящая к развитию протеинопатии (Sweeney et al., 2017). В нервных тканях пациентов с болезнью Альцгеймера содержатся белковые агрегаты – амилоидные бляшки, образованные склонным к агрегации β -амилоидным пептидом, состоящим из 40-42 аминокислотных остатков. Это делает перспективным поиск соединений, ингибирующих патологическую агрегацию данного белка.

Влияние гидроксамовых кислот на процесс агрегации $A\beta_{1-40}$ и $A\beta_{1-42}$ было изучено с помощью метода, основанного на регистрации флюоресценции Тиофлавина Т. На рисунках 34 А и 35 А показано, что флюоресценция Тиофлавина Т, свидетельствующая об активном образовании фибрилл β -амилоида, быстро увеличивалась в течение первых шести часов, а затем постепенно прогрессировала во время 72-часового инкубационного периода. В то же время предварительная обработка β -амилоидных препаратов 1-40 и 1-42 веществами **30**, **31**, **32**, **33** и **34** приводила к заметному

ингибированию фибриллизации данных пептидов в ходе инкубации. Иными словами, все соединения, содержащие адамантановый фрагмент и линкерную часть, проявляли антиагрегационные свойства, при этом наибольшая активность была показана для **30** и **34**. Сравнительным действием обладала гидроксамовая кислота **33**, отличающаяся природой САР-группы. Для этих веществ также были изучены концентрационные зависимости антиагрегационного эффекта (рисунки 34 Б-Г и 35 Б-Г): с увеличением концентрации соединений **30**, **33** и **34** эффективность их действия стремительно увеличивалась.

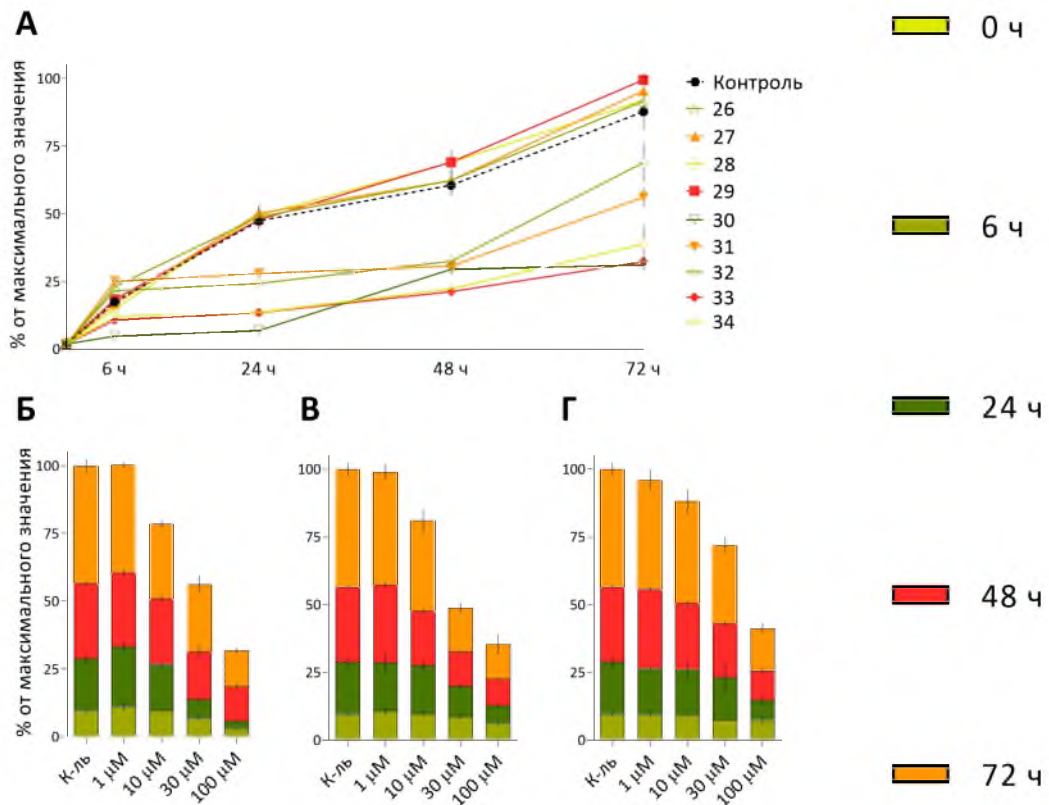


Рисунок 34 – Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры с САР-группой природного происхождения на агрегацию β -амилоида 1-40. А исследуемых соединений составила 100 мкМ. Б-Г - концентрационные зависимости ингибирования агрегации $A\beta_{1-40}$ гидроксамовыми кислотами **30** – Б, **33** – В, **34** – Г. Данные представлены в виде % агрегации β -амилоида относительно максимального значения флюоресценции Тиофлавина Т.

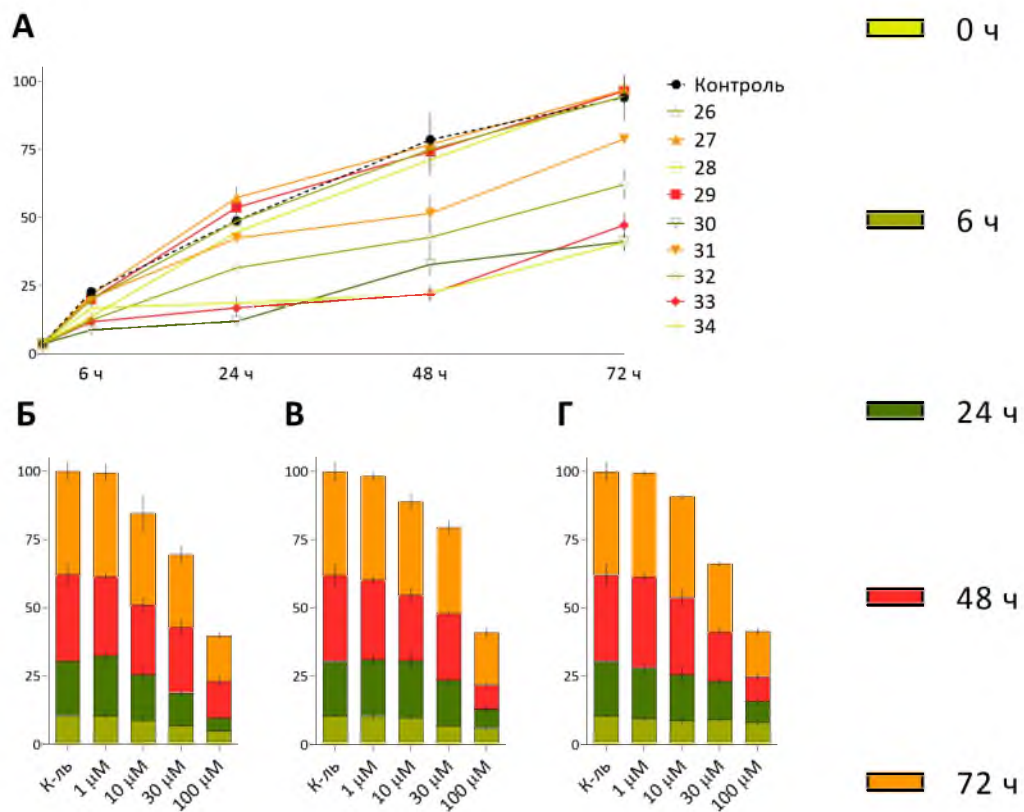


Рисунок 35 – Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры с CAP-группой природного происхождения на агрегацию β -амилоида 1-42. А исследуемых соединений составила 100 мкМ. Б-Г - концентрационные зависимости ингибирования агрегации $A\beta_{1-42}$ гидроксамовыми кислотами **30** – Б, **33** – В, **34** – Г. Данные представлены в виде % агрегации β -амилоида относительно максимального значения флюоресценции Тиофлавина Т.

Такое действие гидроксамовых кислот может быть связано с влиянием как CAP-группы, так и гидроксаматной функции, поскольку ранее аналогичный эффект был обнаружен как для производных адамантана (Takahashi-Ito et al., 2017), так и для соединений на основе гидроксамовой кислоты (Mucke and Selkoe, 2012).

Ввиду того, что большинство соединений класса гидроксамовых кислот обладают высокой цитотоксической активностью и в основном используются как противоопухолевые препараты (Manal et al., 2016), их

использование в качестве лекарственных средств нейропротекторной направленности является ограниченным. Так как цель работы заключалась в поиске агентов для фармакологической коррекции нейродегенеративных заболеваний, необходимым звеном при изучении биологической активности синтезированных гидроксамовых кислот являлось определение их влияния на выживаемость клеточных культур.

Таблица 8 – Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры с САР- группой природного происхождения на выживаемость клеток SH-SY5Y и Нек 293

	IC ₅₀ цитотоксического эффекта, μМ				
	26	27	28	29	30
SH-SY5Y	51,89 ± 3,56	> 100	> 100	> 100	47,56 ± 7,19
Нек 293	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
	31	32	33	34	
SH-SY5Y	> 100	64,15 ± 4,10	51,96 ± 2,61	59,51 ± 0,42	
Нек 293	49,48 ± 3,43	68,28 ± 2,22	60,2 ± 1,00	> 100	

Как видно из таблицы 8 все исследованные гидроксамовые кислоты не проявляли выраженного цитотоксического действия по отношению к клеткам SH-SY5Y и Нек 293, о чем свидетельствуют значения величин IC₅₀ более 50 μМ. Следует отметить, что HDAC-ингибирующая активность ряда синтезированных гидроксамовых кислот находилась в наномолярном диапазоне (рисунок 33), и очевидно, что терапевтическая концентрация веществ будет много ниже значений IC₅₀.

Таким образом, по итогам *in vitro* тестирования наиболее перспективными веществами для исследования нейропротекторной активности *in vivo* были выбраны гидроксамовые кислоты **30** и **34**, которые эффективно ингибировали HDAC6, проявляли A β -антиагрегационные свойства и обладали антиоксидантной активностью без выраженного токсического действия в отношении клеток SH-SY5Y и Hek 293.

3.2.3.2. *In vivo* исследование нейропротекторного потенциала гидроксамовых кислот

Первоначальным этапом *in vivo* исследования было изучение токсических эффектов соединений-лидеров на клинически здоровых животных – мышах-самцах линии C57BL/6. Введение веществ производили внутрибрюшинно в разных концентрациях (максимально 300 мг/кг). Патологических изменений в поведении и физиологическом состоянии животных при этом не наблюдалось. Введение эквивалентного объема растворителя (10% ДМСО в физиологическом растворе) также не привело к каким-либо нарушениям. Таким образом, полученные результаты сделали возможным проведение экспериментов на животных в выбранной эффективной концентрации.

In vivo нейропротекторный потенциал гидроксамовых кислот **30** и **34** был оценен по их влиянию на общее поведение и когнитивные функции трансгенных мышей-самцов 5xFAD (Tg(APP^SwF^Lon, PSEN1*^{M146L}*^{L286V})⁶⁷⁹⁹Vas/J) в возрасте 11 месяцев. Патологический фенотип данной линии мышей включает амилоидные отложения, глиоз, нейродегенерацию, нарушения памяти, накопление внутриклеточного A β и выраженную гибель нейронов, обнаруживаемые при болезни Альцгеймера (Oakley et al., 2006). В качестве контрольной группы были использованы дикотипные животные того же возраста – мыши-самцы линии C57BL/6.

Гидроксамовые кислоты **30** и **34** были растворены в физиологическом растворе и ДМСО (10%) непосредственно перед использованием и ежедневно вводились животным внутрибрюшинно в течение 20 дней в дозе 15 мг/кг. Мышам линии C57BL/6 и животным 5xFAD, не получавшим лечения гидроксамовыми кислотами, вводили растворитель в том же объёме по аналогичному графику. Тестирование начинали на 11 день введения гидроксамовых кислот.

Влияние гидроксамовых кислот на общие поведенческие характеристики животных было изучено в тесте «Открытое поле», где оценивались исследовательская и двигательная активности, а также уровень тревожности. Когнитивно-стимулирующее действие соединений было определено по их влиянию на эпизодическую память в тесте «Распознавание нового объекта» и пространственную память - в тесте «Водный лабиринт Морриса».

При оценке влияния гидроксамовых кислот **30** и **34** на общее поведение мышей не было обнаружено каких-либо отличий в пройденном расстоянии (рисунок 36 А) и средней скорости движения (рисунок 36 Б), а также времени, проведенном в центральной (рисунок 36 В) и периферической областях (рисунок 36 Г) установки между экспериментальными группами, что свидетельствует об отсутствии влияния данных соединений на двигательную активность, ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности.

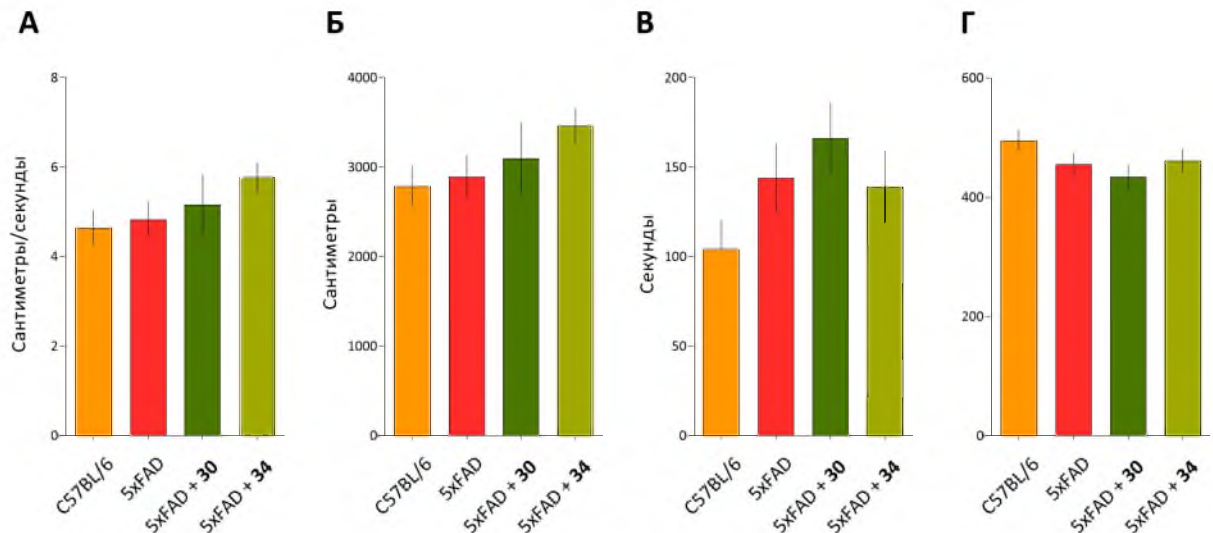


Рисунок 36 – Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры с САР-группой природного происхождения **30** и **34** на общее поведение трансгенных животных линии 5xFAD в тесте Открытое поле. А-Б – пройденная дистанция и средняя скорость движения как показатели двигательной активности; В-Г – время, проведенное в центральной и периферической областях установки как показатели ориентировочно-исследовательского поведения и уровня тревожности мышей. Данные представлены как среднее \pm ОС (количество животных в каждой группе, $n = 8$).

При оценке эпизодической памяти животные как дикого типа, так и из группы 5xFAD + **30**, показали повышенное предпочтение к исследованию нового объекта в тестовом испытании по сравнению с мышами 5xFAD (рисунок 37).

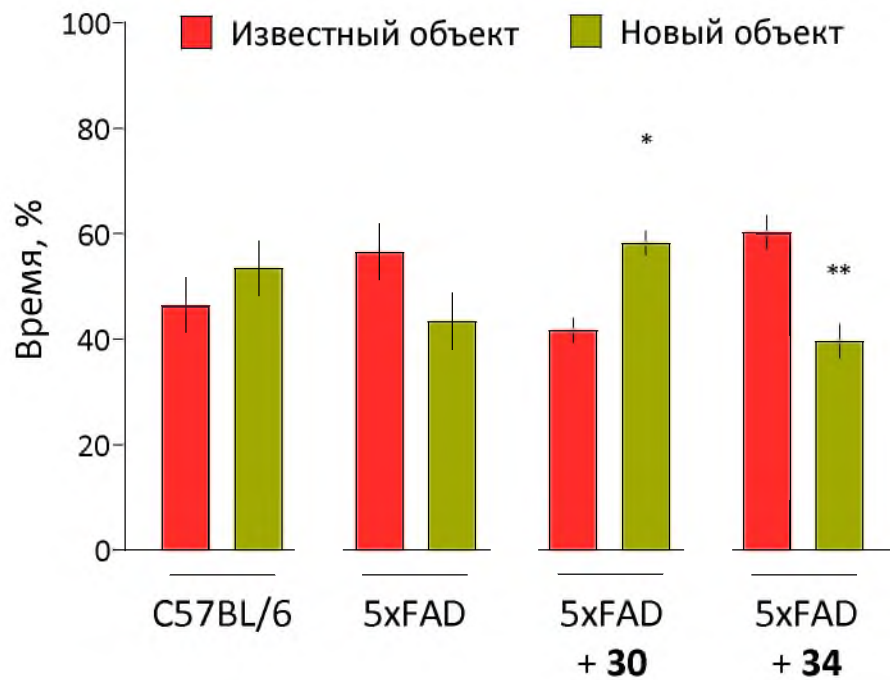


Рисунок 37 – Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры с САР-группой природного происхождения **30** и **34** на эпизодическую память трансгенных животных линии 5xFAD в тесте «Распознавание нового объекта». Данные представлены в виде процента исследования объекта в течение 10-минутной тестовой фазы как среднее \pm ОС (количество животных в каждой группе, $n = 8$). Время, затраченное на изучение каждого объекта показано как отношение к общему времени к исследованию обоих объектов. * и **, $p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно, по сравнению с мышами 5xFAD. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони.

В то время как для мышей дикого типа разница в этом параметре не была достоверной, мыши, получавшие гидроксамовую кислоту **30**, затрачивали значительно больше времени на изучение нового объекта по сравнению с ранее изученным ($p = 0,03$). В то же время у трансгенных животных, не получавших лечения синтезированными соединениями, и у мышей из группы 5xFAD + **34** во время тестового испытания были обнаружены нарушения памяти, что очевидно указывает на проблемы с

гиппокамп-зависимым ассоциативным обучением и формированием эпизодической памяти.

Для оценки влияния гидроксамовых кислот **30** и **34** на процесс пространственного обучения трансгенных животных в тесте Водный лабиринт Морриса было зарегистрировано время, необходимое для достижения скрытой под водой платформы. Во время фазы обучения мыши во всех группах, кроме 5xFAD, показали значительное улучшение данного показателя (рисунок 38 А). Так, латентный период поиска платформы трансгенными мышами, не получавшими лечения, в последний день обучения снизился лишь до $50,47 \pm 4,68$ ($p = 0,85$). В свою очередь, как для дикотипных животных, так и для мышей из групп 5xFAD + **30** и 5xFAD + **34** разница между первым и четвертым днём развития была достоверной и уменьшилась с $53,33 \pm 3,68$ до $34,58 \pm 4,19$ ($p = 0,003$) - для клинически здоровых мышей; с $53,76 \pm 2,79$ до $34,28 \pm 4,32$ ($p = 0,001$) - для 5xFAD + **30**; с $53,46 \pm 2,75$ до $38,63 \pm 3,01$ ($p = 0,016$) - для 5xFAD + **34**. Более того, у мышей, получавших лечение соединением **30**, было выявлено снижение данного показателя уже на третий день обучения ($p = 0,031$), что очевидно, свидетельствуют о способности гидроксамовых кислот восстанавливать нарушения в процессе обучения трансгенных животных 5xFAD.

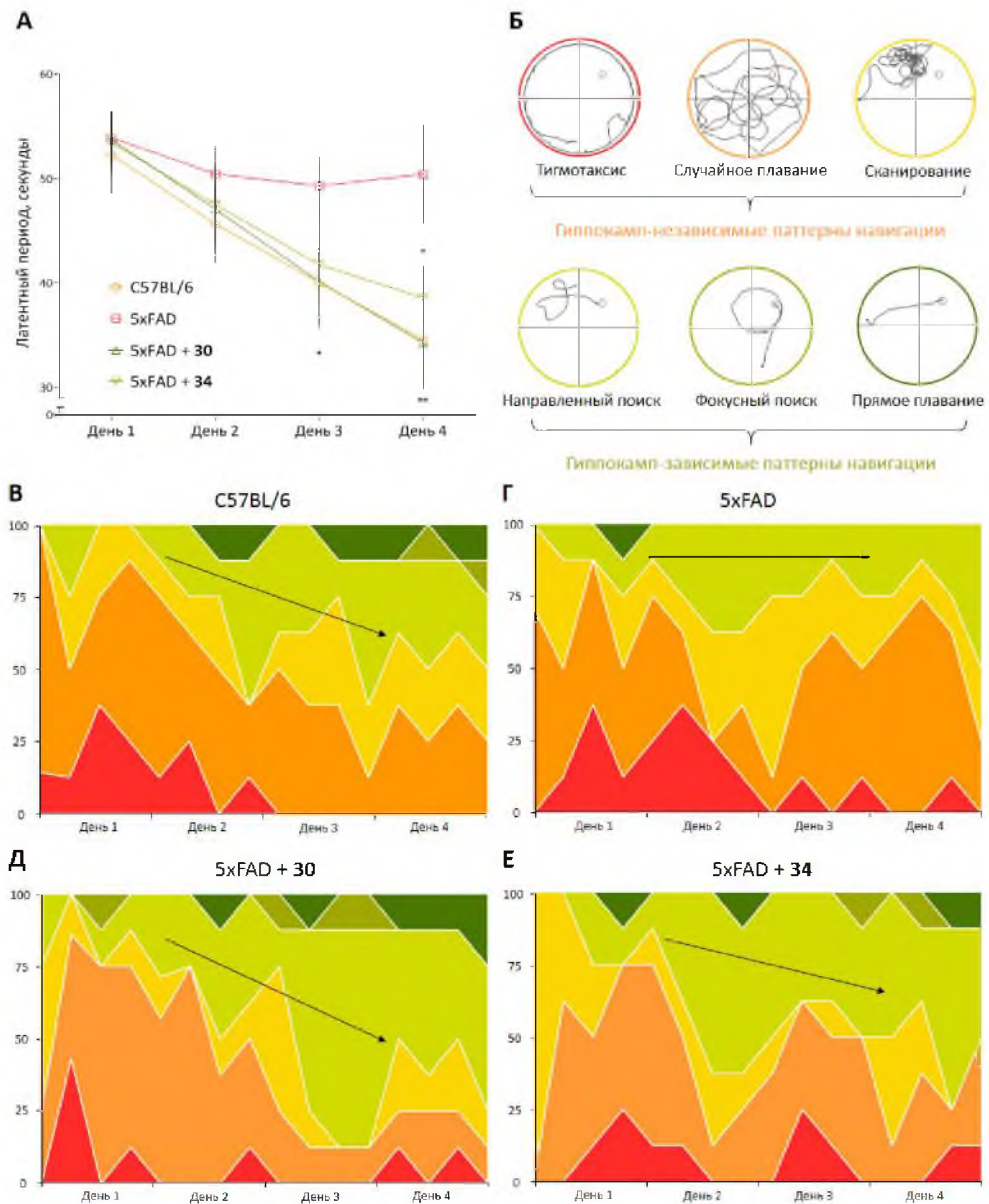


Рисунок 38 – Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры с САР-группой природного происхождения на пространственное обучение мышей 5xFAD. А – латентный период поиска скрытой платформы. Данные представлены как среднее \pm ОС ($n = 8$). * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ vs День 1. ANOVA, поправка Бонферрони. Б – поисковые паттерны платформы. В, Г, Д и Е – когнитивные карты животных на этапе обучения в водном лабиринте Морриса.

Также важным подходом в изучении поведения животных в водном лабиринте Морриса является анализ стратегий поиска скрытой платформы в течение всего периода обучения (рисунок 38 Б) (Wolfer et al., 2001). Его суть

заключается в постепенном переключении гиппокамп-независимой эгоцентрической навигации на гиппокамп-зависимую аллоцентрическую при поиске платформы животными во время фазы обучения. Чаще всего эгоцентрические паттерны наблюдаются в первые дни помещения животного в установку, когда мышь демонстрирует стереотипную последовательность шаблонов поиска скрытой платформы, ориентируясь только на проксимальные, внутренние сигналы. Затем по мере обучаемости начинает включаться гиппокамп-зависимое аллоцентрическое ориентирование с добавлением различных векторов движения и использованием дистальных сигналов (визуальных подсказок, расположенных у бортиков бассейна).

Таким образом, поведение животного в водном лабиринте зависит как от эгоцентрической, так и от аллоцентрической стратегий поиска, причем вклад последней возрастает с помещением животных с различных начальных точек маршрута и повторением испытаний, что характеризует успешность гиппокамп-зависимого пространственного обучения.

При анализе стратегий поиска платформы животных было обнаружено, что в отличие от дикотипных животных (рисунок 38 В) у трансгенных мышей линии 5xFAD, не подвергавшихся лечению, наблюдалось сохранение преимущества использования гиппокамп-независимой эгоцентрической навигации вплоть до четвертого дня обучения (рисунок 38 Г). Это подтверждает известные данные о том, что патологический фенотип данной линии животных характеризуется нарушениями в функционировании нейронов гиппокампальной области и свидетельствует об отсутствии эффективного обучения. В свою очередь гидроксамовая кислота **30** привела к нормализации данной ситуации и успешному формированию аллоцентрической когнитивной карты (рисунок 38 Д) подобно таковой у животных из контрольной группы. Для мышей, получавших лечение соединением **34**, наблюдалась схожая тенденция, но в меньшей степени (рисунок 38 Е).

Кроме того, в последний день эксперимента в водном лабиринте Морриса во время фазы тестирования без платформы было изучено влияние гидроксамовых кислот на формирование пространственной памяти. В качестве показателей успешного формирования памяти были зарегистрированы латентный период и количество входов в область платформы, а также время, проведенное в верном (квадрант, в котором во время периода обучения была расположена платформа) и противоположном верному квадрантах.

Как показано на рисунках 39 А и Б, введение гидроксамовой кислоты **30** достоверно снижало латентный период для входа в зону платформы ($p = 0,01$) и увеличивало количество входов в зону платформы ($p = 0,04$) у мышей, моделирующих болезнь Альцгеймера, до уровня животных дикого типа. В свою очередь улучшение параметров пространственной памяти также наблюдалось у животных 5xFAD + **34** - было обнаружено значительное снижение времени нахождения в противоположном верному квадранте по сравнению с животными 5xFAD, не получавшими лечение ($p = 0,01$) (рисунок 39 Г).

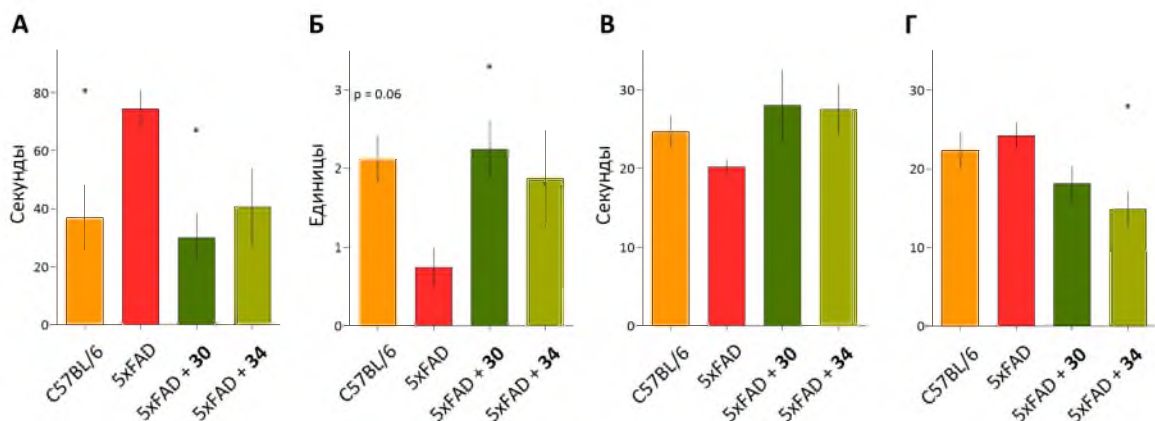


Рисунок 39 – Влияние гидроксамовых кислот линейной структуры **30** и **34** на пространственную память мышей 5xFAD. А – латентный период входа, Б – количество входов в зону платформы; время пребывания в В – верном, Г – противоположном верному квадрантах. Данные представлены как среднее \pm ОС ($n=8$). * $p < 0,05$ vs 5xFAD. ANOVA, поправка Бонферрони.

3.2.3.3. *Ex vivo* исследование нейропротекторного потенциала гидроксамовых кислот

После экспериментов *in vivo* у мышей всех экспериментальных групп был произведен забор образцов головного мозга для определения в них показателей окислительного стресса, таких как уровень МДА, свидетельствующий об интенсивности перекисного окисления липидов, общий пул глутатиона, как маркер работы эндогенной антиоксидантной системы, а также работу комплексов дыхательной цепи митохондрий и отложения патологического β -амилоидного пептида.

При исследовании влияния гидроксамовых кислот на работу собственной антиоксидантной системы защиты было обнаружено, что у трансгенной линии мышей наблюдались патологические изменения в глутатионовой редокс-системе, что выражалось в достоверном снижении общего глутатиона до $7,03 \pm 0,60$ нмоль/мг белка при $11,10 \pm 0,59$ нмоль/мг белка у животных дикого типа ($p < 0,0001$, рисунок 40 А). В то же время для мышей, получавших лечение гидроксамовой кислотой **30**, была выявлена тенденция к восстановлению данного показателя ($p = 0,08$ по сравнению с 5xFAD). Очевидно, описанные нарушения глутатионового звена антиоксидантной системы у 5xFAD мышей могут вызывать дисбаланс в функционировании всей антиоксидантной системы, в частности, активацию процесса перекисного окисления липидов, который рассматривается в качестве основного молекулярного механизма, участвующего в окислительном повреждении клеточных структур (Gaschler and Stockwell, 2017). Так, для трансгенных животных была обнаружена интенсификация данного процесса, о чём свидетельствовало увеличение уровня МДА ($p < 0,05$ по сравнению с дикотипными мышами). В свою очередь для исследуемых соединений влияния на данный показатель не было обнаружено (рисунок 40 Б и В).

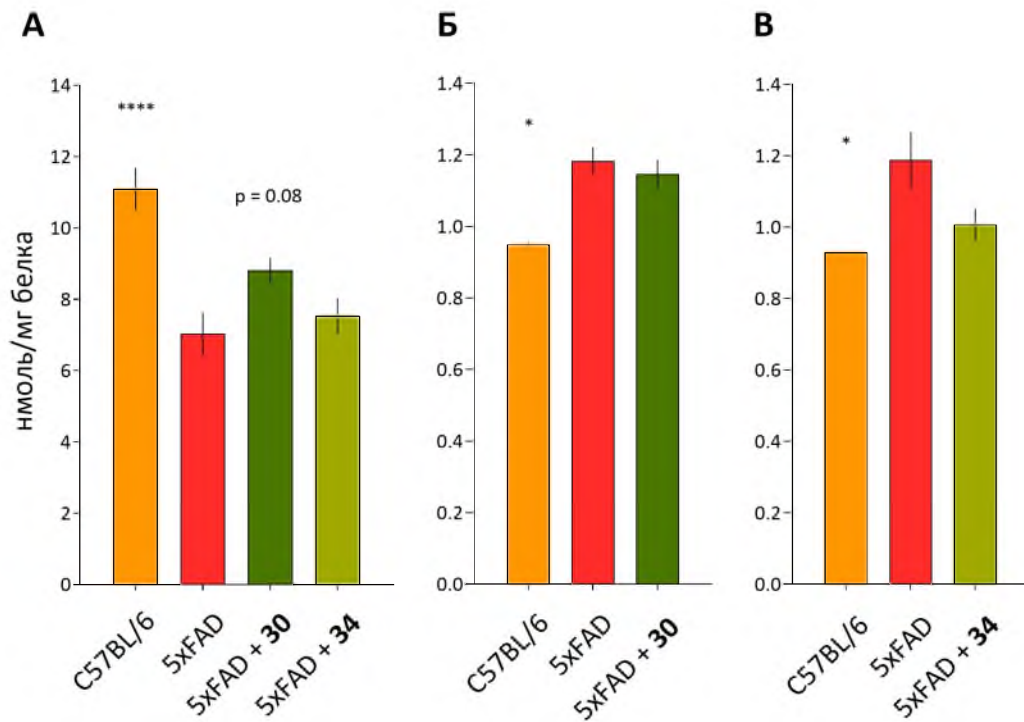


Рисунок 40 – *Ex vivo* анализ уровней глутатиона и МДА в мозге мышей после *in vivo* экспериментов. А – содержание восстановленной формы глутатиона (GSH) и Б, В – уровень МДА в образцах головного мозга животных из групп 5xFAD + 30 и 5xFAD + 34, соответственно. Данные представлены как среднее \pm ОС. *, ****, $p < 0,05$ и $p < 0,0001$, соответственно, по сравнению с 5xFAD. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета.

Для исследования функционирования митохондрий головного мозга животных экспериментальных групп был использован анализатор клеточного метаболизма Seahorse Bioanalyzer (Seahorse Bioscience, США). Анализ работы комплексов дыхательной цепи показал, что после введения сукцината и аскорбата/ГМПД органеллы трансгенных животных потребляли меньше кислорода, чем митохондрии мышей дикого типа. Однако данный показатель был повышен у животных, получавших лечение гидроксамовыми кислотами. Так, после введения сукцината скорость потребления кислорода органеллами мышей из группы 5xFAD + 30 увеличилась со $119,07 \pm 25,51$ пмоль/мин до

251,00 ± 10,45 пмоль/мин, а после введения аскорбата – с 308, 78 ± 59,54 пмоль/мин до 422,67 ± 14,61 пмоль/мин (41 А).

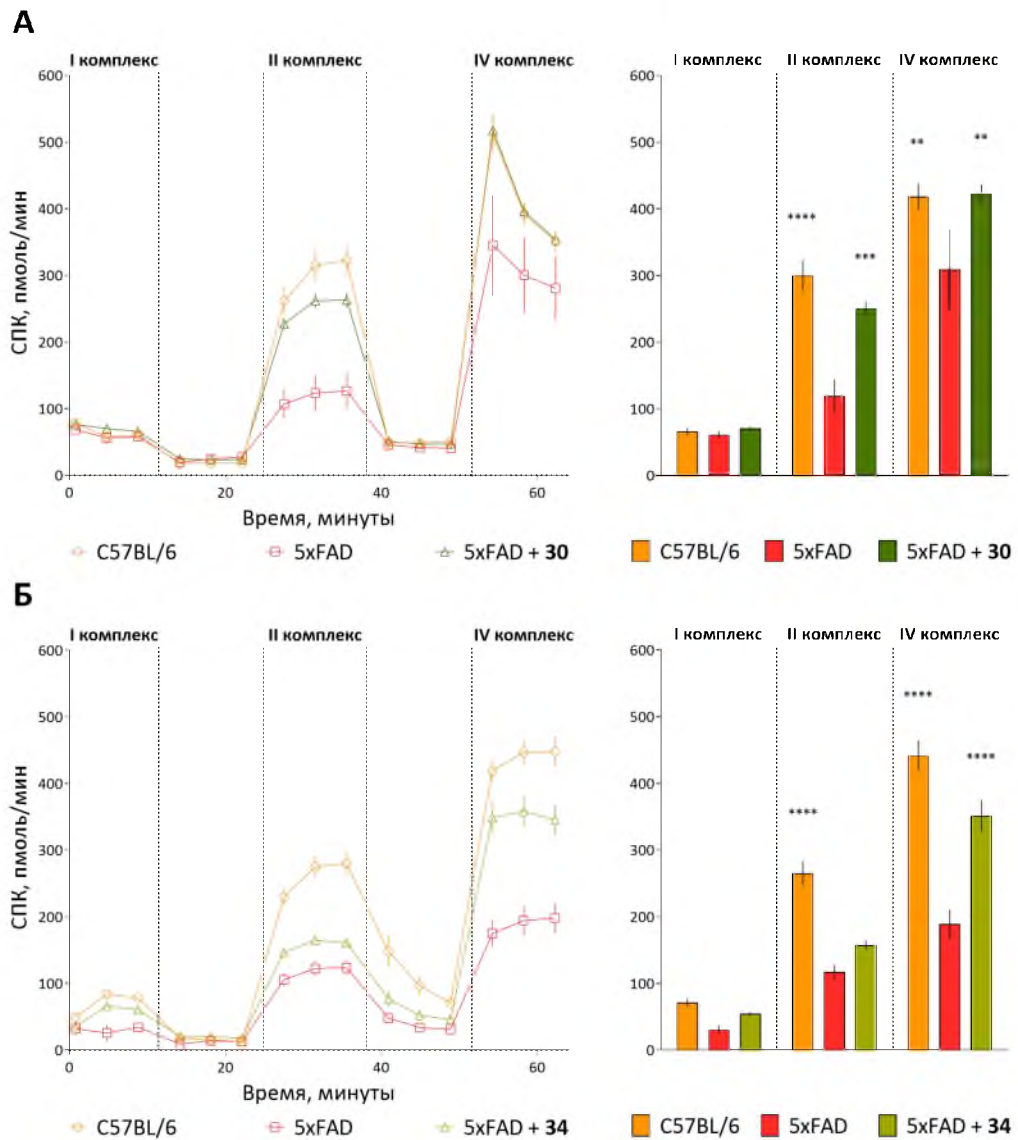


Рисунок 41 – *Ex vivo* анализ работы комплексов электрон-транспортной цепи митохондрий мозга мышей после *in vivo* экспериментов для гидроксамовой кислоты **30** - А и **34** - Б. Концентрация ротенона – 2 мкМ, сукцината калия – 2 мкМ, антимицина А – 4 мкМ, аскорбата/ТМПД – 0,5 мкМ. Данные представлены как среднее ± ОС. **, ***, ****, $p < 0,01$, $p < 0,001$ и $p < 0,0001$, соответственно, по сравнению с 5xFAD. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета.

В то же время для соединения **34** был показан аналогичный эффект в отношении стимуляции IV комплекса митохондриальной дыхательной цепи (рисунок 41 Б).

При окраске срезов головного мозга мышей флуоресцентным красителем Конго красным во всех группах 11-месячных трансгенных мышей наблюдались положительно окрашенные ядра зрелых амилоидных бляшек (рисунок 42 А).

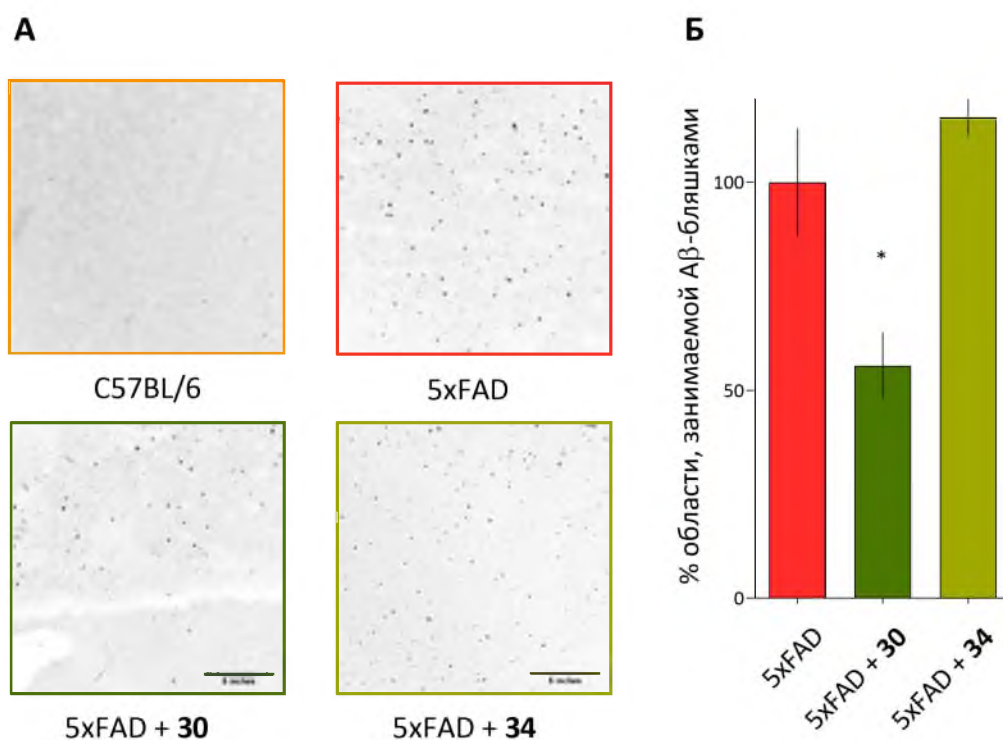


Рисунок 42 – *Ex vivo* анализ площади амилоидных бляшек в образцах головного мозга трансгенных мышей после *in vivo* экспериментов. А – микрофотографии срезов мозга мышей, окрашенных красителем Congo Red для визуализации отложений Aβ. В – процент площади, покрытой амилоидными бляшками, в срезах мозга мышей по отношению к мышам 5xFAD, принятым за 100%. Данные представлены как среднее значение ± ОС. *, $p < 0,05$ по сравнению с 5xFAD. Статистический анализ был проведен с использованием однофакторного дисперсионного анализа с поправкой Даннета.

Однако, количественная оценка выявила значительно более низкое содержание включений у животных, получавших гидроксамовую кислоту **30**. Это соединение приводило к выраженному снижению Конго красных положительных отложений - на 45% ($p = 0,03$) по сравнению с мышами 5xFAD, не получавшими лечения (рисунок 42 Б). Хотя этиология болезни Альцгеймера до сих пор полностью не изучена, накоплены убедительные доказательства корреляции между накоплением $A\beta$ и когнитивными нарушениями (Querfurth and LaFerla, 2010). Очевидно, значительное улучшение когнитивной функции у мышей из группы 5xFAD + **30** коррелирует со снижением отложений $A\beta$.

Таким образом, по совокупности действия на основные патологические процессы, участвующие в патогенезе болезни Альцгеймера, гидроксамовая кислота **30**, содержащая фрагмент адамантана и природных соединений, может рассматриваться в качестве потенциального мультифункционального нейропротекторного соединения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на различия в этиологии и клинических проявлениях, нейродегенеративные патологии и онкологические заболевания имеют ряд общих аспектов развития. Важную роль в течении этих заболеваний играют окислительный стресс, нарушение собственной системы антиоксидантной защиты клетки, митохондриальная дисфункция и изменение уровня ферментов эпигенетической регуляции, в частности, HDACs. В связи с этим манипулирование количеством активных форм кислорода, уровнями и активностью ферментов эндогенной антиоксидантной защиты клетки, модуляция функционирования основных энергетических органелл клетки - митохондрий, регуляция эпигенетических ферментов HDACs - всё это является эффективными средствами коррекции патологий. Так, в случае нейродегенеративных расстройств необходимо предотвратить гибель нервных клеток и защитить их от повреждения. При онкологических состояниях, наоборот, задача состоит в том, чтобы вызвать разрушение опухолевых клеток и привести к их гибели.

Одним из перспективных классов органических веществ, способных осуществлять все эти действия, являются гидроксамовые кислоты. Основные биологические свойства соединений данного класса связаны с их способностью ингибировать металлопротеиназы, прежде всего семейства HDACs. Наиболее изучен потенциал гидроксамовых кислот как ингибиторов HDACs при лечении онкопатологий, что показывает их эффективность в индукции окислительного стресса с нарушением функциональных характеристик митохондрий и запуске митохондриально-зависимого каскада клеточной гибели по пути апоптоза.

Также гидроксамовые кислоты активно исследуются и в качестве потенциальных агентов, направленных на лечение нейродегенеративных заболеваний. В данном случае на первый план выступает не только их ингибирующее действие в отношении соответствующих изоформ HDAC, но

и способность проявлять нейропротекторные свойства, защищая нервные клетки от окислительного стресса, предотвращая дисфункцию митохондрий и повреждение нейронов.

Однако несмотря на активное применение гидроксамовых кислот для фармакологической коррекции как онкологических, так и нейродегенеративных заболеваний, это по-прежнему вызывает ряд проблем, которые в настоящее время активно решаются. Большинство существующих гидроксамовых кислот - ингибиторов гистондеацетилазы - являются панселективными, т. е. активными в отношении всех типов HDACs. Это вызывает значительные изменения в экспрессии генов и приводит к многочисленным побочным эффектам, поскольку HDAC в равной степени участвуют как в выживании, так и в гибели клеток. Поэтому большая часть работ на сегодняшний день направлена на получение изоформ-селективных ингибиторов, способных как повысить эффективность действия, так и уменьшить побочные эффекты при использовании гидроксамовых кислот.

Современные методы медицинской химии позволяют вводить в молекулу гидроксамовой кислоты различные фрагменты фармакофоров, что повышает целевую активность и избирательность действия соединений. Наиболее интересным направлением модификации гидроксамовых кислот является объединение в одной молекуле фрагментов известных препаратов, обладающих высокой аффинностью по отношению к дополнительным молекулярным мишеням, и гидроксамовой кислоты. Такие модификации позволяют получать многоцелевые гибридные молекулы, действующие на специфические молекулярные мишени опухолевых и нейродегенеративных заболеваний.

В связи с этим диссертационное исследование было направлено на поиск потенциальных полифункциональных противоопухолевых или нейропротекторных соединений среди гидроксамовых кислот циклической и линейной структуры, содержащих в молекуле аминокислоты, хиназолиновое ядро или фрагменты адамантана и природных терпеновых соединений.

На основании полученных экспериментальных данных в ходе реализации данной работы был выполнен анализ закономерностей ротаций фармакологического спектра действия гидроксамовых кислот в зависимости от хемотипа. Очевидно, что для спироциклических гидроксамовых кислот характерна тенденция к проявлению противоопухолевых свойств. Это выражалось в способности соединений, содержащих как аминокислоты, так и хиназолиновое ядро, модулировать одновременно несколько ключевых звеньев патогенеза онкологических заболеваний. В свою очередь для веществ линейной структуры, содержащих фармакофорные фрагменты адамантана и природных соединений, наблюдалась способность оказывать нейропротекторное действие за счёт действия на основные патологические процессы, участвующие в патогенезе болезни Альцгеймера. Таким образом, обнаруженные различия в биологической активности соединений, относящихся к одному классу - гидроксамовые кислоты, явно обусловлены структурной модификацией молекулы: введением различных фармакофорных фрагментов, варьированием длиной линкерной части и циклизацией. Полученные знания могут служить существенной предпосылкой при дальнейшем продолжении работ в области создания лекарственных препаратов на основе гидроксамовых кислот при поиске потенциальных как противоопухолевых, так и нейропротекторных средств.

Таким образом, настоящая диссертационная работа позволила сделать вывод о том, что гидроксамовые кислоты являются эффективным средством модуляции онкологических и нейродегенеративных патологий, воздействующим на молекулярные мишени и механизмы, связанные с ключевыми звеньями патогенеза этих заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в ряду спироциклических гидроксамовых кислот, содержащих аминокислоты, соединение с валиновым заместителем, гидроксамовая кислота **3**, является соединением-лидером, обладающим выраженным Fe(II)-хелатирующим действием и ингибирующей активностью в отношении HDAC1. Данные свойства могут рассматриваться в качестве механизмов для хемосенсибилизирующей активности гидроксамовой кислоты **3** на мышинной модели меланомы B16, повышая чувствительность экспериментальной опухоли к действию циклофосфида;
2. Установлено, что спироциклические гидроксамовые кислоты на основе хиназолина проявляют высокую избирательную цитотоксическую активность в отношении клеток опухолевого происхождения, обусловленную способностью модулировать процессы, связанные с окислительным стрессом и функционированием митохондрий, снижать активность HDAC1 и ингибировать гликолиз;
3. Обнаружено, что среди линейных гидроксамовых кислот с CAP-группой природного происхождения выявлено соединение-лидер - гидроксамовая кислота **30**, содержащая в структуре фрагмент адамантана. Данное соединение проявляет комплексный тип нейропротекторной активности за счёт антиоксидантной способности, ингибирования HDAC6 и агрегации A β , а также восстанавливает когнитивные дисфункции мышей 5xFAD, моделирующих болезнь Альцгеймера;
4. На основе анализа особенностей строения исследованных соединений выявлена тенденция спироциклических гидроксамовых кислот проявлять противоопухолевые свойства, а для веществ линейной структуры, содержащих фармакофорные фрагменты адамантана и природных соединений, - оказывать нейропротекторное действие.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НДЗ - нейродегенеративные заболевания

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

HDACs (histone deacetylases) - гистоновые деацетилазы

FDA (Food and Drug Administration) - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

ZBG (zinc binding group) - цинк-связывающая группа

HDACi (histone deacetylase inhibitors) - ингибитор HDAC

IC₅₀ - концентрация полумаксимального ингибирования

SAHA (suberoyl anilide hydroxamic acid) - субероиланилид гидроксамовой кислоты

MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium) - 1-Метил-4-фенилпиридиний

Топо II (topoisomerase II) - топоизомераза II

EGFR (epidermal growth factor receptor) - рецептор эпидермального фактора роста

HER2 - тирозиновая протеинкиназа семейства рецепторов эпидермального фактора роста 2

p53 - белок p53, транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл

АФК - активные форма кислорода

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК - рибонуклеиновая кислота

H₂O₂ - пероксид водорода

ОН[•] - гидроксильный радикал

ОН⁻ - гидроксид-анион

МДА - малоновый диальдегид

4-HNE (4-hydroxy-2-nonenal) - 4-гидрокси-транс-2,3-ноненаль

GPx (glutathione peroxidase) - глутатионпероксидаза

SBHA (suberoyl bis-hydroxamic acid) - субероил бис-гидроксамовой кислота

LOX (lipoxygenases) - липоксигеназа

HETEs (hydroxyeicosatetraenoic acids) - гидроксикозатетраеновые кислоты
 HPETEs (hydroperoxyeicosatetraenoic acids) - гидропероксиэйкозатетраеновые кислоты
 COX (cyclooxygenase) - циклооксигеназа
 Cyt c (Cytochrome C) - цитохром с
 AIF (apoptosis inducing factor) - фактор, вызывающий апоптоз
 АТФ - аденозинтрифосфат
 СОД - супероксиддисмутаза
 Ψ_m - трансмембранный потенциал митохондрий
 MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization) - проницаемость наружной мембраны митохондрий
 Bcl-2 - внутриклеточный белковый фактор, регулирующий апоптоз
 PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) - поли(АДФ-рибоза)-полимераза
 Bax - bcl-2-подобный белок 4, регулирующий апоптоз
 м-РНК - матричная рибонуклеиновая кислота
 TRX - тиоредоксинредуктаза
 mTOR (the mammalian target of rapamycin) - мишень рапамицина млекопитающих
 HAT (histone acetyltransferases) - гистонацетилтрансфераза
 SIRT6 (sirtuins) - сиртуины
 NMDA (N-methyl-D-aspartate) - N-метил-D-аспарат
 GSH - глутатион
 ТМПД - N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин дигидрохлорид
 ЛД₅₀ - доза вещества, вызывающая гибель половины особей группы
 NEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
 ЭГТА - этиленгликольтетрауксусная кислота
 ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
 ТБК - тиобарбитуровая кислота
 ПОЛ - перекисное окисление липидов

t-БГП - трет-бутилгидроксипероксид

ДФПГ - 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил

2-DG - 2-фтор-2-дезоксид-D-глюкоза

PBS (phosphate-buffered saline) - натрий-фосфатный буфер

MEM (minimum essential medium) - питательная среда Игла

DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) - модифицированная по способу

Дульбекко питательная среда MEM

RPMI-1640 (Roswell park memorial institute 1640 Medium) - питательная среда

Игла

МТТ - 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид

ДМСО - диметилсульфоксид

ИИМ - индекс ингибирования метастазирования

ЦФ - циклофосфамид

Клеточные линии

HeLa - карцинома шейки матки

SH-SY5Y - нейробластома

MDA-MB-231 - аденокарцинома молочной железы

A549 - карцинома лёгкого

HCT-116 - карцинома толстой кишки

Calu-6 - карцинома легкого

SK-LU-1 - аденокарцинома легкого

HCC-1588 - аденокарцинома легкого

NCI-H1299 - карцинома легкого

HSAEC - первичные эпителиальные клетки малых дыхательных путей

HPF - первичная культура фибробластов лёгкого

U87MG - глиобластома

MGC-803 - аденокарцинома желудка

MKN28 - аденокарцинома желудка

ESCC - плоскоклеточная карцинома пищевода

U937 - миелодный лейкоз

Jurkat - острый Т-клеточный лейкоз

HEK 293 - клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Климанова, Е.Н. Цитотоксические свойства новых спироциклических гидроксамовых кислот / Е.Н. Климанова, Ю.Р. Александрова, М.Е. Неганова, В.Н. Осипов и С.Г. Клочков // Сборник научных трудов «Концепции современного образования: новации в системе научного знания». – 2020. – С. 239-243.
2. Abbaszadeh, Z. Crucial players in glycolysis: Cancer progress / Z. Abbaszadeh, S. Cesmeli and C. Biray Avci // Gene. – 2020. – V. 726. – P. 144-158.
3. Akerman, K.E. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential / K.E. Akerman and M.K. Wikstrom // FEBS Lett. – 1976. – V. 68. – №2. – P. 191-197.
4. Aliev, G. Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice / G. Aliev, M.E. Obrenovich, V.P. Reddy, J.C. Shenk, P.I. Moreira, A. Nunomura, X. Zhu, M.A. Smith and G. Perry // Mini Rev Med Chem. – 2008. – V. 8. – №13. P. 1395-1406.
5. Aliev, G. Link between cancer and Alzheimer disease via oxidative stress induced by nitric oxide-dependent mitochondrial DNA overproliferation and deletion / G. Aliev, M.E. Obrenovich, S. Tabrez, N.R. Jabir, V.P. Reddy, Y. Li, G. Burnstock, R. Cacabelos and M.A. Kamal // Oxid Med Cell Longev. – 2013. – V. 2013. – P. 962984.
6. Aliev, G. Oxidative stress mediated mitochondrial and vascular lesions as markers in the pathogenesis of Alzheimer disease / G. Aliev, M. Priyadarshini, V.P. Reddy, N.H. Grieg, Y. Kaminsky, R. Cacabelos, G.Md. Ashraf, N.R. Jabir, M.A. Kamal, V.N. Nikolenko, A.A. Zamyatnin Jr, V.V. Benberin and S.O. Bachurin // Curr Med Chem. – 2014. – V. 21. – №19. – P. 2208-2217.
7. Arimura, Y. Structural features of nucleosomes in interphase and metaphase chromosomes / Y. Arimura, R.M. Shih, R. Froom and H. Funabiki // Mol Cell. – 2021. – V. 81. – №21. – P. 4377-4397.

8. Arts, J. JNJ-26481585, a novel "second-generation" oral histone deacetylase inhibitor, shows broad-spectrum preclinical antitumoral activity / J. Arts, P. King, A. Marien, W. Floren, A. Belien, L. Janssen, I. Pilatte, B. Roux, L. Decrane, R. Gilissen, I. Hickson, V. Vreys, E. Cox, K. Bol, W. Talloen, I. Goris, L. Andries, M. Du Jardin, M. Janicot, M. Page, K. van Emelen and P. Angibaud // *Clin Cancer Res.* – 2009. – V. 15. – №22. – P. 6841-6851.
9. Asfaha, Y. Novel alkoxyamide-based histone deacetylase inhibitors reverse cisplatin resistance in chemoresistant cancer cells / Y. Asfaha, C. Schrenk, L.A. Alves Avelar, F. Lange, C. Wang, J.J. Bandolik, A. Hamacher, M.U. Kassack and T. Kurz // *Bioorg Med Chem.* – 2020. – V. 285. – №1. – P. 115108.
10. Attard, A. Delirium and its treatment / A. Attard, G. Ranjith, D. Taylor // *CNS Drugs.* – 2008. – V. 22. – №8. – P. 631-644.
11. Aventaggiato, M. Sirtuins' control of autophagy and mitophagy in cancer / M. Aventaggiato, E. Vernucci, F. Barreca, M.A. Russo and M. Tafani // *Pharmacol Ther.* – 2021. – V. 221. – P. 107748.
12. Bansal, A. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance / A. Bansal and M.C. Simon // *J Cell Biol.* – 2018. – V. 217. – №7. – P. 2291-2298.
13. Benedetti, R. Targeting Histone Deacetylases in Diseases: Where Are We? / R. Benedetti, M. Conte and L. Altucci // *Antioxid Redox Signal.* – 2015. – V. 23. – №1. – P. 99-126.
14. Benito, E. HDAC inhibitor-dependent transcriptome and memory reinstatement in cognitive decline models / E. Benito, H. Urbanke, B. Ramachandran, J. Barth, Rashi Halder, A. Awasthi, G. Jain, V. Capece, S. Burkhardt, M. Navarro-Sala, S. Nagarajan, A.-L. Schütz, S.A. Johnsen, S. Bonn, R. Lührmann, C. Dean and A. Fischer // *J Clin Inves.* – 2015. – V. 125. – №9. – P. 3572-3584.
15. Berg, D. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease / D. Berg, M. Gerlach, M.B. Youdim, K.L. Double, L. Zecca, P. Riederer and G. Becker // *J. Neurochem.* – 2001. – V. 79. – №2. – P. 225-236.

16. Bernstein, B.E. Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast / B.E. Bernstein, J.K. Tong, S.L. Schreiber // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2000. – V. 97. – №25. – P. 13708-13713.
17. Bhat, A. H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight / A.H. Bhat, K.B. Dar, S. Anees, M.A. Zargar, A. Masood, M.A. Sofi and S.A. Ganie // Biomed Pharmacother. – 2015. – V. 74. – P. 101-110.
18. Bieliauskas, A.V. Structural Requirements of Histone Deacetylase Inhibitors: SAHA Analogs Modified on the Hydroxamic Acid / A.V. Bieliauskas, S.V. Weerasinghe, A.T. Negmeldin and M.K. Pflum // Arch Pharm (Weinheim). – 2016. – V. 349. – №5. – P. 373-382.
19. Bonner, M.Y. The antioxidant paradox: what are antioxidants and how should they be used in a therapeutic context for cancer / M.Y. Bonner and J.L. Arbiser // Future Med Chem. – 2014. – V. 6. – №12. – P. 1413-1422.
20. Borgna-Pignatti, C. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine / C. Borgna-Pignatti, S. Rugolotto, P. De Stefano, H. Zhao, M.D. Cappellini, G.C. Del Vecchio, M.A. Romeo, G.L. Forni, M.R. Gamberini, R. Ghilardi, A. Piga and A. Cnaan // Haematologica. – 2004. – V. 89. – №10. – P. 1187-1193.
21. Botos, I. Batimastat, a potent matrix metalloproteinase inhibitor, exhibits an unexpected mode of binding / I. Botos, L. Scapozza, D. Zhang, L.A. Liotta and E.F. Meyer // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1996. – V. 93. – №7. – P. 2749-2754.
22. Bradner, J.E. Chemical phylogenetics of histone deacetylases / J.E. Bradner, N. West, M.L. Grachan, E.F. Greenberg, S.J. Haggarty, T. Warnow and R. Mazitschek // Nat Chem Biol. – 2010. – V. 6. – №3. – P. 238-243.
23. Brahim-Horn, M.C. Hypoxia signalling controls metabolic demand / M.C. Brahim-Horn, J. Chiche and J. Pouyssegur // Curr Opin Cell Biol. – 2007. – V. 19. – №2. – P. 223-229.

24. Brewer, G.J. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons / G.J. Brewer and T.W. Wallimann // *J Neurochem.* – 2000. – V. 74. – №5. – P. 1968-1978.
25. Brown, D.A. A DFT study of model complexes of zinc hydrolases and their inhibition by hydroxamic acids / D.A. Brown, L.P. Cuffe, N.J. Fitzpatrick and A.T. Ryan // *Inorg Chem.* – 2004. – V. 43. – №1. – P. 297-302.
26. Cappellacci, L. Recent Progress in Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Agents / L. Cappellacci, D.R. Perinelli, F. Maggi, M. Grifantini and R. Petrelli // *Curr Med Chem.* – 2020. – V. 27. – №15. – P. 2449-2493.
27. Carocci, A. Oxidative stress and neurodegeneration: the involvement of iron / A. Carocci, A. Catalano, M.S. Sinicropi and G. Genchi // *Biometals.* – 2018. – V. 31. – №5. – P. 715-735.
28. Carretero, J. Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells / J. Carretero, E. Obrador, M.J. Anasagasti, J.J. Martin, F. Vidal-Vanaclocha and J.M. Estrela // *Clin Exp Metastasis.* – 1999. – V. 17. – №7. – P. 567-574.
29. Chang, H. Identification of genes related to a synergistic effect of taxane and suberoylanilide hydroxamic acid combination treatment in gastric cancer cells / H. Chang, S. Y. Rha, H.-C. Jeung, J.-J. Jung, T.S. Kim, H.J. Kwon, B.S. Kim and H.C. Chung // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 2010. – V. 136. – №12. – P. 1901-1913.
30. Chen, D. Peptide deformylase inhibitors as antibacterial agents: identification of VRC3375, a proline-3-alkylsuccinyl hydroxamate derivative, by using an integrated combinatorial and medicinal chemistry approach / D. Chen, C. Hackbarth, Z.J. Ni, C. Wu, W. Wang, R. Jain, Y. He, K. Bracken, B. Weidmann, D.V. Patel, J. Trias, R.J. White and Z. Yuan // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – V. 48. – №1. – P. 250-261.
31. Chen, J. Design, synthesis and anticancer evaluation of acridine hydroxamic acid derivatives as dual Topo and HDAC inhibitors / J. Chen, D. Li, W. Li, J.

- Yin, Y. Zhang, Z. Yuan, C. Gao, F. Liu and Y. Jiang // *Bioorg Med Chem.* – 2018. – V. 26. – №14. – P. 3958-3966.
32. Chen, S.H. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, protects dopaminergic neurons from neurotoxin-induced damage / S.H. Chen, H.M. Wu, B. Ossola, N. Schendzielorz, B.C. Wilson, C.H. Chu, S.L. Chen, Q. Wang, D. Zhang, L. Qian, X. Li, J.S. Hong and R.B. Lu // *Br J Pharmacol.* – 2012. – V. 165. – №2. – P. 494-505.
33. Chiurchiu, V. Is Modulation of Oxidative Stress an Answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases / V. Chiurchiu, A. Orlicchio and M. Maccarrone // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – V. 2016. – P. 7909380.
34. Choi, S. E. The structural requirements of histone deacetylase inhibitors: suberoylanilide hydroxamic acid analogs modified at the C6 position / S.E. Choi and M.K. Pflum // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2012. – V. 22. – №23. – P. 7084-7086.
35. Choi, S. E. The structural requirements of histone deacetylase inhibitors: Suberoylanilide hydroxamic acid analogs modified at the C3 position display isoform selectivity / S.E. Choi, S.V. Weerasinghe and M.K. Pflum // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2011. – V. 21. – №20. – P. 6139-6142.
36. Chopra, A. Cloning of the guinea pig 5-lipoxygenase gene and nucleotide sequence of its promoter / A. Chopra, D.L. Ferreira-Alves, P. Sirois and J.P. Thirion // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1992. – V. 185. – №2. – P. 489-495.
37. Chopra, V. LBH589, A Hydroxamic Acid-Derived HDAC Inhibitor, is Neuroprotective in Mouse Models of Huntington's Disease / V. Chopra, L. Quinti, P. Khanna, P. Paganetti, R. Kuhn, A.B. Young, A.G. Kazantsev and S. Hersch // *J Huntingtons Dis.* – 2016. – V. 5. – №4. – P. 347-355.
38. Connolly, P.J. N-hydroxyurea and hydroxamic acid inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase / P.J. Connolly, S.K. Wetter, K.N. Beers, S.C. Hamel, R.H. Chen, M.P. Wachter, J. Ansell, M.M. Singer, M. Steber,

- D.M. Ritchie and D.C. Argentieri // *Bioorg Med Chem Lett.* – 1999. – V. 9. – №7. – P. 979-984.
39. Connor-Robson, N. Combinational losses of synucleins reveal their differential requirements for compensating age-dependent alterations in motor behavior and dopamine metabolism / N. Connor-Robson, O.M. Peters, S. Millership, N. Ninkina and V.L. Buchman // *Neurobiol Aging.* – 2016. – V. 46. – P.107-112.
40. Corce, V. Recent advances in cancer treatment by iron chelators / V. Corcé, S.G. Gouin, S. Renaud, F. Gaboriau and D. Deniaud // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2016. – V. 26. – №2. – P. 251-256.
41. Daško, M. HDAC Inhibitors: Innovative Strategies for Their Design and Applications / M. Daško, B. de Pascual-Teresa, I. Ortín and A. Ramos // *Molecules.* – 2022. – V. 27. – P. 715.
42. de Ruijter, A. J. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family / A.J.M. de Ruijter, A.H. van Gennip, H.N. Caron, S. Kemp and A.B.P. van Kuilenburg // *Biochem J.* – 2003. – V. 370. – P. 737-749.
43. Desagher, S. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis / S. Desagher, A. Osen-Sand, A. Nichols, R. Eskes, S. Montessuit, S. Lauper, K. Maundrell, B. Antonsson and J.C. Martinou // *J Cell Biol.* – 1999. – V. 144. – №5. – P. 891-901.
44. Ding, C. Synthesis and investigation of novel 6-(1,2,3-triazol-4-yl)-4-aminoquinazolin derivatives possessing hydroxamic acid moiety for cancer therapy / C. Ding, S. Chen, C. Zhang, G. Hu, W. Zhang, L. Li, Y. Zong Chen, C. Tan and Y. Jiang // *Bioorg Med Chem.* – 2017. – V. 25. – №1. – P. 27-37.
45. Dooley, C.M. A novel family of hydroxamate-based acylating inhibitors of cyclooxygenase / C.M. Dooley, M. Devocelle, B. McLoughlin, K.B. Nolan, D.J. Fitzgerald and C.T. Sharkey // *Mol Pharmacol.* – 2003. – V. 63. – №2. – P. 450-455.

46. Doughty, M.J. A Grid-Based Nucleus Counting Method for Estimates of the Density of Superficial Conjunctival Cells from Impression Cytology Samples Taken from Normal Healthy Human Eyes / M.J. Doughty // *Curr Eye Res* 2017. – V. 42. – №9. – P. 1228-1234.
47. Eckert, A. Mitochondrial dysfunction - the beginning of the end in Alzheimer's disease? Separate and synergistic modes of tau and amyloid-beta toxicity / A. Eckert, K. Schmitt and J. Gotz // *Alzheimers Res Ther.* – 2011. – V. 3. – №2. – P. 15.
48. Faria Freitas, M. HDAC inhibitors: a 2013-2017 patent survey / M. Faria Freitas, M. Cuendet and P. Bertrand // *Expert Opin Ther Pat.* – 2018. – P. 1-17.
49. Fiser, B. Antioxidant potential of glutathione: a theoretical study / B. Fiser, M. Szori, B. Jójárt, R. Izsák, I.G. Csizmadia and B. Viskolcz // *J Phys Chem B.* – 2011. – V. 115. – №38. – P. 11269-11277.
50. Fortin, S. Advances in the development of hybrid anticancer drugs / S. Fortin and G. Berube // *Expert Opin Drug Discov.* – 2013. – V. 8. – №8. – P. 1029-1047.
51. Gaschler, M.M. Lipid peroxidation in cell death / M.M. Gaschler and B.R. Stockwell // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2017. – V. 482. – №3. – P. 419-425.
52. Giannini, G. Hydroxamic acid based histone deacetylase inhibitors with confirmed activity against the malaria parasite / G. Giannini, G. Battistuzzi and D. Vignola // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2015. – V. 25. – №3. – P. 459-461.
53. Goncharova, S.A. The Effectiveness of Cyclic Hydroxamic Acid CHA-5 against Drug-Resistant P388 Leukemia Strains / S.A. Goncharova, I.V. Vystorop, T.A. Raevskaya and N.P. Konovalova // *Bull Exp Biol Med.* – 2017. – V. 163. – №3. – P. 385-388.
54. Greilberger, J. Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease / J. Greilberger, C. Koidl, M. Greilberger, M. Lamprecht, K. Schroecksnadel, F.

- Leblhuber, D. Fuchs and K. Oettl // *Free Radic Res.* – 2008. – V. 42. – №7. – P. 633-638.
55. Gross, A. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis / A. Gross, J. Jockel, M.C. Wei and S.J. Korsmeyer // *EMBO J.* – 1998. – V. 17. – №14. – P. 3878-3885.
56. Gross, A. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis / A. Gross, J.M. McDonnell and S.J. Korsmeyer // *Genes Dev.* – 1999. – V. 13. – №15. – P. 1899-1911.
57. Guan, J.S. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity / J.-S. Guan, S.J. Haggarty, E. Giacometti, J.-He. Dannenberg, N. Joseph, J. Gao, T.J.F. Nieland, Y. Zhou, X. Wang, R. Mazitschek, J.E. Bradner, R.A. DePinho, Ru. Jaenisch and L.-H. Tsai // *Nature.* – 2009. – V. 459. – №7243. – P. 55-60.
58. Guerrant, W. Dual targeting of histone deacetylase and topoisomerase II with novel bifunctional inhibitors / W. Guerrant, V. Patil, J.C. Canzoneri and A.K. Oyelere // *J Med Chem.* – 2012. – V. 55. – №4. – P. 1465-1477.
59. Gulcin, I. Screening of antiradical and antioxidant activity of monodesmosides and crude extract from *Leontice smirnowii* tuber / I. Gülçin, V. Mshvildadze, A. Gepdiremen and R. Elias // *Phytomedicine.* – 2006. – V. 13. – №5. – P. 343-351.
60. Guo, Y. Trichostatin A attenuates oxidative stress-mediated myocardial injury through the FoxO3a signaling pathway / Y. Guo, Z. Li, C. Shi, J. Li, M. Yao and X. Chen // *Int J Mol Med.* – 2017. – V. 40. – №4. – P. 999-1008.
61. Gupta, S.P. QSAR studies on hydroxamic acids: a fascinating family of chemicals with a wide spectrum of activities / S.P. Gupta // *Chem Rev.* – 2013. – V. 115. – №13. – P. 6427-6490.
62. Gupta, S. P., Sharma, A. *The Chemistry of Hydroxamic Acids* / S.P. Gupta and A. Sharma // *Hydroxamic Acids.* – 2013. – P. 1-17.

63. Haberland, M. Redundant control of adipogenesis by histone deacetylases 1 and 2 / M. Haberland, M. Carrer, M.H. Mokalled, R.L. Montgomery and E.N. Olson // *J Biol Chem.* – 2010. – V. 285. – №19. – P. 14663-14670.
64. Halliwell, B. *Free Radicals in Biology and Medicine* / B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge // Oxford University Press. – 1999. – V. 3.
65. Heinicke, U. Critical role of mitochondria-mediated apoptosis for JNJ-26481585-induced antitumor activity in rhabdomyosarcoma / U. Heinicke, J. Kupka, I. Fichter and S. Fulda // *Oncogene.* – 2016. – V. 35. – №28. – P. 3729-3741.
66. Hieu, D.T. Quinazolin-4(3H)-one-Based Hydroxamic Acids: Design, Synthesis and Evaluation of Histone Deacetylase Inhibitory Effects and Cytotoxicity / D.T. Hieu, D.T. Anh, P.-T. Hai, N.T. Thuan, L.-T.-T. Huong, E.J. Park, A.Y. Ji, J.S. Kang, P.T.P. Dung, S.-B. Han and N.-H. Nam // *Chem Biodivers.* – 2019. – V. 16. – №4. – P. e1800502.
67. Hockly, E. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease / E. Hockly, V.M. Richon, B. Woodman, D.L. Smith, X. Zhou, E. Rosa, K. Sathasivam, S. Ghazi-Noori, A. Mahal, P.A.S. Lowden, J.S. Steffan, J.L. Marsh, L.M. Thompson, C.M. Lewis, P.A. Marks and G.P. Bates // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – V. 100. – №4. – P. 2041-2046.
68. Hrabeta, J. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. A review / J. Hrabeta, M. Stiborova, V. Adam, R. Kizek and T. Eckschlager // *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* – 2014. – V. 158. – №2. – P. 161-169.
69. Hrzenjak, A. SAHA induces caspase-independent, autophagic cell death of endometrial stromal sarcoma cells by influencing the mTOR pathway / A. Hrzenjak, M.-L. Kremser, B. Strohmeier, F. Moinfar, K. Zatloukal and H. Denk // *J Pathol.* – 2008. – V. 216. – №4. – P. 495-504.

70. Hsu, Y. T., Youle, R. J. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations / Y.T. Hsu and R.J. Youle // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273. – №17. – P. 10777-10783.
71. Hu, M. Lysine Acetylation, Cancer Hallmarks and Emerging Onco-Therapeutic Opportunities / M. Hu, F. He, E.W. Thompson, K.K. Ostrikov and X. Dai // *Cancers (Basel).* – 2022. – V. 14. – №2.
72. Huang, J. Unilateral amyloid-beta25-35 injection into the rat amygdala increases the expressions of aberrant tau phosphorylation kinases / J. Huang, Y.-j. Chen, W.-h. Bian, J. Yu, Y.-w. Zhao and X.-y. Liu // *Chin Med J (Engl).* – 2010. – V. 123. – №10. – P. 1311-1314.
73. Huang, M. Small molecule HDAC inhibitors: Promising agents for breast cancer treatment / M. Huang, J. Zhang, C. Yan, X. Li, J. Zhang and R. Ling // *Bioorg Chem.* – 2019. – V. 91. – P. 103184.
74. Huang, Y. Droxinostat sensitizes human colon cancer cells to apoptotic cell death via induction of oxidative stress / Y. Huang, W. Yang, H. Zeng, C. Hu, Y. Zhang, N. Ding, G. Fan, L. Shao and B. Kuang // *Cell Mol Biol Lett.* – 2018. – V. 23. – P. 34.
75. Huang, Z.Z. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration / Z.Z. Huang, C. Chen, Z. Zeng, H. Yang, J. Oh, L. Chen and S.C. Lu // *FASEB J.* – 2001. – V. 15. – №1. – P. 19-21.
76. Jinsmaa, Y. Products of oxidative stress inhibit aldehyde oxidation and reduction pathways in dopamine catabolism yielding elevated levels of a reactive intermediate / Y. Jinsmaa, V.R. Florang, J.N. Rees, D.G. Anderson, S. Strack and J.A. Doorn // *Chem Res Toxicol.* – 2009. – V. 22. – №5. – P. 835-841.
77. Jones, S.F. A phase I study of panobinostat in combination with gemcitabine in the treatment of solid tumors / S.F. Jones, J.C. Bendell, J.R. Infante, D.R. Spigel, D.S. Thompson, D.A. Yardley, F.A. Greco, P.B. Murphy and H.A. Burris // *Clin Adv Hematol Oncol.* – 2011. – V. 9. – №3. – P. 225-230.

78. Jung, C.H. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery / H.H. Jung, C.B. Jun, S.-H. Ro, Y.-M. Kim, Ne.M. Otto, J. Cao, M. Kundu and D.-H. Kim // *Mol Biol Cell*. – 2009. – V. 20. – №7. – P. 1992-2003.
79. Keeble, J.A. Apoptosis commitment--translating survival signals into decisions on mitochondria / J.A. Keeble and A.P. Gilmore // *Cell Res*. – 2007. – V. 17. – №12. – P. 976-984.
80. Keller, T.H. A practical view of 'druggability' / T.H. Keller, A. Pichota and Z. Yin // *Curr Opin Chem Biol*. – 2006. – V. 10. – №4. – P. 357-361.
81. Kholmukhamedov, A., Jobe, S. Mitochondria and Platelet Cell Death / A. Kholmukhamedov and S. Jobe // *Thromb Haemost*. – 2017. – V. 117. – №11. – P. 2207-2208.
82. Kim, M.K. A novel hydroxamic acid derivative, MHY218, induces apoptosis and cell cycle arrest through downregulation of NF-kappaB in HCT116 human colon cancer cells / M.K. Kim, Y.J. Kang, D.H. Kim, M.A. Hossain, J.Y. Jang, S.H. Lee, J.-H. Yoon, P. Chun, H.R. Moon, H.S. Kim, H.Y. Chung and N.D. Kim // *Int J Oncol*. – 2014. – V. 44. – №1. – P. 256-264.
83. Kroemer, G. Death, danger, and immunity: an infernal trio / G. Kroemer and L. Zitvogel // *Immunol Rev*. – 2007. – V. 220. – P. 5-7.
84. Kumar, V. Understanding the Role of Histone Deacetylase and their Inhibitors in Neurodegenerative Disorders: Current Targets and Future Perspective / V. Kumar, S. Kundu, A. Singh and S. Singh // *Curr Neuropharmacol*. – 2022. – V. 20. – №1. – P. 158-178.
85. Lan, L. Deferoxamine suppresses esophageal squamous cell carcinoma cell growth via ERK1/2 mediated mitochondrial dysfunction / L. Lan, W. Wei, Y. Zheng, L. Niu, X. Chen, D. Huang, Y. Gao, S. Mo, J. Lu, M. Guo, Y. Liu and B. Lu // *Cancer Lett*. – 2018. – V. 432. – P. 132-143.
86. Langley, B. Pulse inhibition of histone deacetylases induces complete resistance to oxidative death in cortical neurons without toxicity and reveals a role for cytoplasmic p21(waf1/cip1) in cell cycle-independent neuroprotection /

- B. Langley, M.A. D'Annibale, K. Suh, I. Ayoub, A. Tolhurst, B. Bastan, L. Yang, B. Ko, M. Fisher, S. Cho, M.F. Beal and R.R. Ratan // *J Neurosci.* – 2008. – V. 28. – №1. – P. 163-176.
87. Le Bras, M. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death / M. Le Bras, M.V. Clement, S. Pervaiz and C. Brenner // *Histol Histopathol.* – 2005. – V. 20. – №1. – P. 205-219.
88. Lee, H.Y. 5-Aroylindoles Act as Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors Ameliorating Alzheimer's Disease Phenotypes / H.Y. Lee, S.J. Fan, F.I. Huang, H.Y. Chao, K.C. Hsu, T.E. Lin, T.K. Yeh, M.J. Lai, Y.H. Li, H.L. Huang, C.R. Yang and J.P. Liou // *J Med Chem.* – 2018. – V. 61. – №16. – P. 7087-7102.
89. Li, H. In vivo Anticancer Potential of Hydroxamic Acid Derivatives / H. Li, Y. Gong and Q. Zhong // *Curr Top Med Chem.* – 2021. – V. 21. – №19. – P. 1737-1755.
90. Li, H. R-eriodictyol and S-eriodictyol exhibited comparable effect against H₂O₂-induced oxidative stress in EA.hy926 cells / H. Li, C. Li, T. Shen, L. Zhao and D. Ren // *Drug Discov Ther.* – 2014. – V. 8. – №5. – P. 218-224.
91. Li, X. Selective HDAC inhibitors with potent oral activity against leukemia and colorectal cancer: Design, structure-activity relationship and anti-tumor activity study / X. Li, Y. Zhang, Y. Jiang, J. Wu, E.S. Inks, C.J. Chou, S. Gao, J. Hou, Q. Ding, J. Li, X. Wang, Y. Huang and W. Xu // *Eur J Med Chem.* – 2017. – V. 134. – P. 185-206.
92. Liao, B. Suberoylanilide hydroxamic acid enhances chemosensitivity to 5-fluorouracil in hepatocellular carcinoma via inhibition of thymidylate synthase / B. Liao, H. Liang, J. Chen, Q. Liu, B. Zhang and X. Chen // *Tumour Biol.* – 2015. – V. 36. – №12. – P. 9347-9356.
93. Lin, M.T. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases / M.T. Lin and M.F. Beal // *Nature.* – 2006. – V. 443. – №7113. – P. 787-795.
94. Ling, Y. Development of novel beta-carboline-based hydroxamate derivatives as HDAC inhibitors with antiproliferative and antimetastatic activities in

- human cancer cells / Y. Ling, J. Guo, Q. Yang, P. Zhu, J. Miao, W. Gao, Y. Peng, J. Yang, K. Xu, B. Xiong, G. Liu, J. Tao, L. Luo, Q. Zhu and Y. Zhang // *Eur J Med Chem.* – 2018. – V. 144. – P. 398-409.
95. Lossen, H. Synthesis of oxahydroxamic acid / H. Lossen // *Liebigs Ann Chem.* – 1869. – V. 150. – P. 314-316.
96. Lu, H. The in vitro and vivo anti-tumor effects and molecular mechanisms of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and MG132 on the aggressive phenotypes of gastric cancer cells / H. Lu, X.F. Yang, X.Q. Tian, S.L. Tang, L.Q. Li, S. Zhao and H.C. Zheng // *Oncotarget.* – 2016. – V. 7. – №35. – P. 56508-56525.
97. Lu, S.C. Regulation of glutathione synthesis / S.C. Lu // *Mol Aspects Med.* – 2009. – V. 30. – №1-2. – P. 42-59.
98. Lueptow, L.M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice / L.M. Lueptow // *J Vis Exp.* – 2017. – V. 126.
99. Magri, A. VDAC1 as Pharmacological Target in Cancer and Neurodegeneration: Focus on Its Role in Apoptosis / A. Magri, S. Reina and V. De Pinto // *Front Chem.* – 2018. – V. 6. – P. 108.
100. Manal, M. Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review / M. Manal, M.J. Chandrasekar, J. Gomathi Priya and M.J. Nanjan // *Bioorg Chem.* – 2016. – V. 67. – P. 18-42.
101. Marmion, C.J. Hydroxamic Acids – An Intriguing Family of Enzyme Inhibitors and Biomedical Ligands / C.J. Marmion, D. Griffith and K. Nolan // *Eur. J. Inorg. Chem.* – 2004. – V. 15. – P. 3003-3016.
102. Marotta, G. Memantine Derivatives as Multitarget Agents in Alzheimer's Disease / G. Marotta, F. Basagni, M. Rosini and A. Minarini // *Molecules.* – 2020. – V. 25. – P. 17.
103. Matsui, H. Modulation of optical density by sulfhydryl reagents in microbiuret method: a modified method for protein determination in the presence of sulfhydryl reagents / H. Matsui, T. Kurosaki, M. Tokuda and O. Hatase // *Acta Med Okayama.* – 1983. – V. 37. – №2. – P. 125-129.

104. Mayr, C. HDAC Screening Identifies the HDAC Class I Inhibitor Romidepsin as a Promising Epigenetic Drug for Biliary Tract Cancer / C. Mayr, T. Kiesslich, S. Erber, D. Bekric, H. Dobias, M. Beyreis, M. Ritter, T. Jager, B. Neumayer, P. Winkelmann, E. Klieser and D. Neureiter // *Cancers (Basel)*. – 2021. – V. 13. – №15.
105. Mehndiratta, S. 4-Indolyl-N-hydroxyphenylacrylamides as potent HDAC class I and IIB inhibitors in vitro and in vivo / S. Mehndiratta, R.S. Wang, H.L. Huang, C.J. Su, C.M. Hsu, Y.W. Wu, S.L. Pan and J.P. Liou // *Eur J Med Chem*. – 2017. – V. 134. – P. 13-23.
106. Milackova, I. Screening for antiradical efficiency of 21 semi-synthetic derivatives of quercetin in a DPPH assay / I. Milackova, L. Kovacikova, M. Veverka, J. Gallovic and M. Stefek // *Interdiscip Toxicol*. – 2013. – V. 6. – №1. – P. 13-17.
107. Millan-Zambrano, G. Histone post-translational modifications - cause and consequence of genome function / G. Millan-Zambrano, A. Burton, A.J. Bannister and R. Schneider // *Nat Rev Genet*. – 2022. – V. 23. – №9. – P. 563-580.
108. Miranda, M.A. Chemosensitizing Effect of Cernumidine Extracted from *Solanum cernuum* on Bladder Cancer Cells in Vitro / M.A. Miranda, A. Mondal, M. Sachdeva, H. Cabral, Y. Neto, I. Khan, M. Groppo, J.D. McChesney and J.K. Bastos // *Chem Biodivers*. – 2019. – V. 16. – №10. – P. e1900334.
109. Mishchenko, D.V. Chemosensitizing Activity of Histone Deacetylases Inhibitory Cyclic Hydroxamic Acids for Combination Chemotherapy of Lymphatic Leukemia / D.V. Mishchenko, M.E. Neganova, E.N. Klimanova, T.E. Sashenkova, S.G. Klochkov, E.F. Shevtsova, I.V. Vystorop, V.V. Tarasov, V.N. Chubarev, A.N. Samsonova, G.M. Ashraf, G. Barreto, N.S. Yarla and G. Aliev // *Curr Cancer Drug Targets*. – 2018. – V. 1. – №4. – P. 365-371.

110. Montgomery, R.L. Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development / R.L. Montgomery, J. Hsieh, A.C. Barbosa, J.A. Richardson and E.N. Olson // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2009. – V. 106. – №19. – P. 7876-7881.
111. Morphy, R. Designing multiple ligands - medicinal chemistry strategies and challenges / R. Morphy and Z. Rankovic // *Curr Pharm Des*. – 2009. – V. 15. – №6. – P. 587-600.
112. Morris, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat / R. Morris // *J Neurosci Methods*. – 1984. – V. 11. – №1. – P. 47-60.
113. Morrison, B.E. Histone deacetylases: focus on the nervous system / B.E. Morrison, N. Majdzadeh and S.R. D'Mello // *Cell Mol Life Sci*. – 2007. – V. 64. – №17. – P. 2258-2269.
114. Mottamal, M. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents / M. Mottamal, S. Zheng, T.L. Huang and G. Wang // *Molecules*. – 2015. – V. 20. – №3. – P. 3898-3941.
115. Mrakovcic, M. Histone Deacetylase Inhibitor-Induced Autophagy in Tumor Cells: Implications for p53 / M. Mrakovcic, J. Kleinheinz and L.F. Frohlich // *Int J Mol Sci*. – 2017. – V. 18. – №9.
116. Mucke, L. Neurotoxicity of amyloid beta-protein: synaptic and network dysfunction / L. Mucke and D.J. Selkoe // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2012. – V. 2. – №7. – P. a006338.
117. Muri, E.M. Hydroxamic acids as pharmacological agents / E.M. Muri, M.J. Nieto, R.D. Sindelar and J.S. Williamson // *Curr Med Chem*. – 2002. – V. 9. – №17. – P. 1631-1653.
118. Muri, E.M. Hydroxamic Acids as Pharmacological Agents: An Update / E.M. Muri, M.J. Nieto and J.S. Williamson // *Med. Chem. Rev.* – 2004. – P. 1.
119. Mut-Salud, N. Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results / N. Mut-Salud, P.J. Alvarez,

- J.M. Garrido, E. Carrasco, A. Aranega and F. Rodriguez-Serrano // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – V. 2016. – P. 6719534.
120. Nechushtan, A. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death / A. Nechushtan, C.L. Smith, Y.T. Hsu and R.J. Youle // *EMBO J.* – 1999. – V. 18. – №9. – P. 2330-2341.
121. Neganova, M. Novel Multitarget Hydroxamic Acids with a Natural Origin CAP Group against Alzheimer's Disease: Synthesis, Docking and Biological Evaluation / M. Neganova, Y. Aleksandrova, E. Suslov, E. Mozhaitsev, A. Munkuev, D. Tsypyshev, M. Chicheva, A. Rogachev, O. Sukocheva, K. Volcho and S. Klochkov // *Pharmaceutics.* – 2021a. – V. 13. – №11.
122. Neganova, M.E. Promising Molecular Targets for Pharmacological Therapy of Neurodegenerative Pathologies / M.E. Neganova, Y.R. Aleksandrova, V.O. Nebogatikov, S.G. Klochkov and A.A. Ustyugov // *Acta Naturae.* – 2020a. – V. 12. – №3. – P. 60-80.
123. Neganova, M.E. Target-oriented search for neuroprotective compounds in a series of spirocyclic hydroxamic acids / M.E. Neganova, Y.R. Aleksandrova, V.N. Osipov and S.G. Klochkov // *European Neuropsychopharmacology.* – 2019. – V. 29. – №S6. – P. 135-136.
124. Neganova, M.E. Mechanisms of cytotoxic action of a series of directionally synthesized heterocyclic hydroxamic acids / M.E. Neganova, Y.R. Aleksandrova, S.A. Pukhov, S.G. Klochkov and V.N. Osipov // *Biomed Khim.* – 2020b. – V. 66. – №4. – P. 332-338.
125. Neganova, M.E. Histone modifications in epigenetic regulation of cancer: Perspectives and achieved progress / M.E. Neganova, S.G. Klochkov, Y.R. Aleksandrova and G. Aliev // *Semin Cancer Biol.* – 2022. – V. 83. – P. 452-471.
126. Neganova, M.E. The Hydroxamic Acids as Potential Anticancer and Neuroprotective Agents / M.E. Neganova, S.G. Klochkov, Y.R. Aleksandrova and G. Aliev // *Curr Med Chem.* – 2021b. – V. 28. – №39. – P. 8139-8162.

127. Neganova, M.E. New Spirocyclic Hydroxamic Acids as Effective Antiproliferative Agents / M.E. Neganova, S.G. Klochkov, Y.R. Aleksandrova, V.N. Osipov, D.V. Avdeev, S.A. Pukhov, A.V. Gromyko and G. Aliev // *Anticancer Agents Med Chem.* – 2021c. – V. 21. – №5. – P. 597-610.
128. Neganova, M.E. Securinine derivatives as potential anti-amyloid therapeutic approach / M.E. Neganova, S.G. Klochkov, L.N. Petrova, E.F. Shevtsova, S.V. Afanasieva, E.S. Chudinova, V.P. Fisenko, S.O. Bachurin, G.E. Barreto and G. Aliev // *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets.* –2017. – V. 16. – P. 351-355.
129. Negmeldin, A.T. The structural requirements of histone deacetylase inhibitors: C4-modified SAHA analogs display dual HDAC6/HDAC8 selectivity / A.T. Negmeldin, J.R. Knoff and M.K.H. Pflum // *Eur J Med Chem.* – 2018. – V. 143. – P. 1790-1806.
130. Negmeldin, A.T. Structural Requirements of HDAC Inhibitors: SAHA Analogues Modified at the C2 Position Display HDAC6/8 Selectivity / A.T. Negmeldin, G. Padige, A.V. Bieliauskas and M.K. Pflum // *ACS Med Chem Lett.* – 2017. – V. 8. – №3. – P.281-286.
131. Negmeldin, A.T. The structural requirements of histone deacetylase inhibitors: SAHA analogs modified at the C5 position display dual HDAC6/8 selectivity / A.T. Negmeldin and M.K.H. Pflum // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2017. – V. 27. – №15. – P. 3254-3258.
132. Ninkina, N. Neurons expressing the highest levels of gamma-synuclein are unaffected by targeted inactivation of the gene / N. Ninkina, K. Papachroni, D.C. Robertson, O. Schmidt, L. Delaney, F. O'Neill, F. Court, A. Rosenthal, S.M. Fleetwood-Walker, A.M. Davies and V.L. Buchman // *Mol Cell Biol.* – 2003. – V. 23. – №22. – P. 8233-8245.
133. Nunez-Alvarez, Y. HDAC11: a multifaceted histone deacetylase with proficient fatty deacylase activity and its roles in physiological processes / Y. Nunez-Alvarez and M. Suelves // *FEBS J.* – 2022. – V. 289. – №10. – P. 2771-2792.

134. Nunomura, A. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease / A. Nunomura, G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E.K. Balraj, P.K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C.S. Atwood, R.B. Petersen and M.A. Smith // *J Neuropathol Exp Neurol.* – 2001. – V. 60. – №8. – P. 759-767.
135. Oakley, H. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease m. Logan, E. Maus, P. Shao, J. Craft, A. Guillozet-Bongaarts, M. Ohno, J. Disterhoft, L. Van Eldik, R. Berry and R. Vassar // *J Neurosci.* – 2006. – V. 26. – №40. – P. 10129-10140.
136. Olivieri, N.F. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia / N.F. Olivieri and G.M. Brittenham // *Blood.* – 1997. – V. 89. – №3. – P. 739-761.
137. Olson, D.E. Hydroxamate-based histone deacetylase inhibitors can protect neurons from oxidative stress via a histone deacetylase-independent catalase-like mechanism / D.E. Olson, S.F. Sleiman, M.W. Bourassa, F.F. Wagner, J.P. Gale, Y.L. Zhang, R.R. Ratan and E.B. Holson // *Chem Biol.* – 2015. – V. 22. – №4. – P. 439-445.
138. Orafaie, A. The importance of 15-lipoxygenase inhibitors in cancer treatment / A. Orafaie, M.M. Matin and H. Sadeghian // *Cancer Metastasis Rev.* – 2018. – V. 37. – №2-3. – P. 397-408.
139. Parkkila, S. HFE mutations do not account for transfusional iron overload in patients with acute myeloid leukemia / S. Parkkila, O. Niemela, E.R. Savolainen and P. Koistinen // *Transfusion.* – 2001. – V. 41. – №6. – P. 828-831.
140. Parra, M. Regulatory signal transduction pathways for class IIa histone deacetylases / M. Parra and E. Verdin // *Curr Opin Pharmacol.* – 2010. – V. 10. – №4. – P. 454-460.
141. Phan, H.T.T. Polyphenols Modulate Alzheimer's Amyloid Beta Aggregation in a Structure-Dependent Manner / H.T.T. Phan, K. Samarath, Y. Takamura,

- A.F. Azo-Oussou, Y. Nakazono and M.C. Vestergaard // *Nutrients*. – 2019. – V. 11. – P. 4.
142. Pojani, E. Selective Inhibitors of Histone Deacetylase 10 (HDAC-10) / E. Pojani, and D. Barlocco // *Curr Med Chem*. – 2022. – V. 29. – №13. – P. 2306-2321.
143. Prabst, K. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin / K. Prabst, H. Engelhardt, S. Ringgeler and H. Hubner // *Methods Mol Biol*. – 2017. – V. 1601. – P. 1-17.
144. Pulya, S. HDAC6 as privileged target in drug discovery: A perspective / S. Pulya, S.A. Amin, N. Adhikari, S. Biswas, T. Jha and B. Ghosh // *Pharmacol Res*. – 2021. – V.163. – P. 105274.
145. Qin, H.T. Selective histone deacetylase small molecule inhibitors: recent progress and perspectives / H.T. Qin, H.Q. Li and F. Liu // *Expert Opin Ther Pat*. – 2017. – V. 27. – №5. – P. 621-636.
146. Qing, H. Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models / H. Qing, G. He, P.T.T. Ly, C.J. Fox, M. Staufenbiel, F. Cai, Z. Zhang, S. Wei, X. Sun, C.-H. Chen, W. Zhou, K. Wang and W. Song // *J Exp Med*. – 2008. – V. 205. – №12. – P. 2781-2789.
147. Qiu, X. Histone deacetylases inhibitors (HDACis) as novel therapeutic application in various clinical diseases / X. Qiu, X. Xiao, N. Li and Y. Li // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. – 2017. – V. 72. – P. 60-72.
148. Querfurth, H.W. Alzheimer's disease / H.W. Querfurth and F.M. LaFerla // *N Engl J Med*. – 2010. – V. 362. – №4. – P. 329-344.
149. Rajulu, G.G. New hydroxamic acid derivatives of fluoroquinolones: synthesis and evaluation of antibacterial and anticancer properties / G.G. Rajulu, H.S.B. Naik, A. Viswanadhan, J. Thiruvengadam, K. Rajesh, S. Ganesh, H. Jagadheshan and P.K. Kesavan // *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. – 2014. – V. 62. – №2. – P. 168-175.

150. Rani, R. Bioactive heterocycles containing endocyclic N-hydroxy groups / R. Rani and C. Granchi // *Eur J Med Chem.* – 2015. – V. 97. – P. 505-524.
151. Rao, M. Evaluation of the efficacy of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) in enhancing the effects of first-line tuberculosis drugs against intracellular Mycobacterium tuberculosis / M. Rao, D. Valentini, A. Zumla and M. Maeurer // *Int J Infect Dis.* – 2018. – V. 69. – P. 78-84.
152. Rasmussen, M.L. A prospective study of coronary heart disease and the hemochromatosis gene (HFE) C282Y mutation: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study / M.L. Rasmussen, A.R. Folsom, D.J. Catellier, M.Y. Tsai, U. Garg and J.H. Eckfeldt // *Atherosclerosis.* – 2001. – V. 154. – №3. – P. 739-746.
153. Reichert, N. Multiple roles of class I HDACs in proliferation, differentiation, and development / N. Reichert, M.A. Choukrallah and P. Matthias // *Cell Mol Life Sci.* – 2012. – V. 69. – №13. – P. 2173-2187.
154. Richa, S. A New Histone Deacetylase Inhibitor, MHY4381, Induces Apoptosis via Generation of Reactive Oxygen Species in Human Prostate Cancer Cells / S. Richa, P. Dey, C. Park, J. Yang, J.Y. Son, J.H. Park, S.H. Lee, M.Y. Ahn, I.S. Kim, H.R. Moon and H.S. Kim // *Biomol Ther (Seoul).* – 2020. – V. 28. – №2. – P. 184-194.
155. Ricobaraza, A. Phenylbutyrate rescues dendritic spine loss associated with memory deficits in a mouse model of Alzheimer disease / A. Ricobaraza, M. Cuadrado-Tejedor, S. Marco, I. Pérez-Otaño and A. García-Osta // *Hippocampus.* – 2012. – V. 22. – №5. – P. 1040-1050.
156. Rikiishi, H. Chemosensitization of oral squamous cell carcinoma cells to cisplatin by histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid / H. Rikiishi, F. Shinohara, T. Sato, Y. Sato, M. Suzuki and S. Echigo // *Int J Oncol.* – 2007. – V. 30. – №5. – P. 1181-1188.
157. Riviuccio, M.A. HDAC6 is a target for protection and regeneration following injury in the nervous system / M.A. Riviuccio, C. Brochier, D.E. Willis, B.A. Walker, M.A. D'Annibale, K. McLaughlin, A. Siddiq, A.P.

- Kozikowski, S.R. Jaffrey, J.L. Twiss and R.R. Ratan // Brett Langley Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. – V. 106. – №46. – P. 19599-19604.
158. Ryu, H. Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway / H. Ryu, J. Lee, B.A. Olofsson, A. Mwidau, A. Dedeoglu, M. Escudero, E. Flemington, J. Azizkhan-Clifford, R. Ferrante and R.R. Ratan // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2003. – V. 100. – №7. – P. 4281-4286.
159. Sabnis, R. W. Novel HDAC1 and HDAC2 Inhibitors for Treating Diseases / R.W. Sabnis // ACS Med Chem Lett. – 2021. – V. 12. – №10. – P. 1532-1533.
160. Sani, M. Synthesis and evaluation of stereopure atrifluoromethyl-malic hydroxamates as inhibitors of matrix metalloproteinases / M. Sani, D. Belotti and R. Giavazzi // Tetrahedron Lett. – 2004. – V. 45. – P. 1611-1615.
161. Scolnick, L.R. Novel Binding Mode of Hydroxamate Inhibitors to Human Carbonic Anhydrase II / L.R. Scolnick, A.M. Clements, J. Liao, L. Crenshaw, M. Hellberg, J. May J., T.R. Dean and D.W. Christianson // J Am Chem Soc. – 1997. – V. 119. – P. 850-851.
162. Sellmer, A. Marbostat-100 Defines a New Class of Potent and Selective Antiinflammatory and Antirheumatic Histone Deacetylase 6 Inhibitors / A. Sellmer, H. Stangl, M. Beyer, E. Grunstein, M. Leonhardt, H. Pongratz, E. Eichhorn, S. Elz, B. Striegl, Z. Jenei-Lanzl, S. Dove, R.H. Straub, O.H. Kramer and S. Mahboobi // J Med Chem. – 2018. – V. 61. – №8. – P. 3454-3477.
163. Seo, S.Y. Multi-targeted hybrids based on HDAC inhibitors for anti-cancer drug discovery / S.Y. Seo // Arch Pharm Res. – 2012. – V. 35. – №2. – P. 197-200.
164. Shah, R. R. Safety and Tolerability of Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors in Oncology / R.R. Shah // Drug Saf. – 2019. – V. 42. – №2. – P. 235-245.
165. Shen, S. A patent review of histone deacetylase 6 inhibitors in neurodegenerative diseases (2014-2019) / S. Shen and A.P. Kozikowski // Expert Opin Ther Pat. – 2020. – V. 30. – №2. – P. 121-136.

166. Shi, X.Y. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor, Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA), Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cell Lines via the Akt/FOXO3a Signaling Pathway / X.Y. Shi, W. Ding, T.Q. Li, Y.X. Zhang and S.C. Zhao // *Med Sci Monit.* – 2017. – V. 23. – P. 5793-5802.
167. Shimizu, T. Phase I first-in-human study of CUDC-101, a multitargeted inhibitor of HDACs, EGFR, and HER2 in patients with advanced solid tumors / T. Shimizu, P.M. LoRusso, K.P. Papadopoulos, A. Patnaik, M. Beeram, L.S. Smith, D.W. Rasco, T.A. Mays, G. Chambers, A. Ma, J. Wang, R. Laliberte, M. Voi and A.W. Tolcher // *Clin Cancer Res.* – 2014. – V. 20. – №19. – P. 5032-5040.
168. Sieradzki, A. Implication of oncogenic signaling pathways as a treatment strategy for neurodegenerative disorders - contemporary approaches / A. Sieradzki, B.B. Yendluri, H.H. Palacios, K. Parvathaneni, V.P. Reddy, M.E. Obrenovich, K. Gąsiorowski, Je. Leszek and G. Aliev // *CNS Neurol Disord Drug Targets.* – 2011. – V. 10. – №2. – P. 175-183.
169. Singh, A.K. Nucleosome Positioning and Spacing: From Mechanism to Function / A.K. Singh and F. Mueller-Planitz // *J Mol Biol.* – 2021. – V. 433. – №6. – P. 166847.
170. Sleiman, S.F. Histone Deacetylase Inhibitors and Mithramycin A Impact a Similar Neuroprotective Pathway at a Crossroad between Cancer and Neurodegeneration / S.F. Sleiman¹, J. Berlin, M. Basso, S.S. Karuppagounder, J. Rohr and R.R. Ratan // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2011. – V. 4. – №8. – P. 1183-1195.
171. Sleiman, S.F. Hydroxamic acid-based histone deacetylase (HDAC) inhibitors can mediate neuroprotection independent of HDAC inhibition / S.F. Sleiman, D.E. Olson, M.W. Bourassa, S.S. Karuppagounder, Y.-L. Zhang, J. Gale, F.F. Wagner, M. Basso, G. Coppola, J.T. Pinto, E.B. Holson and R.R. Ratan // *J Neurosci.* – 2014. – V. 34. – №43. – P. 14328-14337.
172. Song, Y. A novel class of anthraquinone-based HDAC6 inhibitors / Y. Song, J. Lim and Y.H. Seo // *Eur J Med Chem.* – 2019. – V. 164. – P. 8263-272.

173. Steele, N.L. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of an oral formulation of the histone deacetylase inhibitor Belinostat (PXD101) / N.L. Steele, J.A. Plumb, L. Vidal, J. Tjørnelund, P. Knoblauch, P. Buhl-Jensen, R. Molife, R. Brown, J.S. de Bono and T.R.J. Evans // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2011. – V. 67. – №6. – P. 1273-1279.
174. Steele, N.L. A phase 1 pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the histone deacetylase inhibitor belinostat in patients with advanced solid tumors / N.L. Steele, J.A. Plumb, L. Vidal, J. Tjørnelund, P. Knoblauch, A. Rasmussen, C.E. Ooi, P. Buhl-Jensen, R. Brown, T.R. Jeffry Evans and J.S. DeBono // *Clin Cancer Res.* – 2008. – V. 14. – №3. – P. 804-810.
175. Steffan, J.S. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila* / J.S. Steffan, L. Bodai, J. Pallos, M. Poelman, A. McCampbell, B.L. Apostol, A. Kazantsev, E. Schmidt, Y.Z. Zhu, M. Greenwald, R. Kurokawa, D.E. Housman, G.R. Jackson, J.L. Marsh and L.M. Thompson // *Nature.* – 2001. – V. 413. – №6857. – P. 739-743.
176. Steward, W.P. Marimastat: the clinical development of a matrix metalloproteinase inhibitor / W.P. Steward and A.L. Thomas // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2000. – V. 9. – №12. – P. 2913-2922.
177. Stokes, G. An improved Congo red method for amyloid / G. Stokes // *Med Lab Sci.* – 1976. – V. 33. – №1. – P. 79-80.
178. Su, H. Competitive or noncompetitive, that's the question: research toward histone deacetylase inhibitors / H. Su, L. Altucci and Q. You // *Mol Cancer Ther.* – 2008. – V. 7. – №5. – P. 1007-1012.
179. Summers, J.B. Hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase: quantitative structure-activity relationships / J.B. Summers, K.H. Kim, H. Mazdiasni, J.H. Holms, J.D. Ratajczyk, A.O. Stewart, R.D. Dyer and G.W. Carter // *J Med Chem.* – 1990. – V. 33. – №3. – P. 992-998.
180. Summers, J.B. Hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase / J.B. Summers, H. Mazdiasni, J.H. Holms, J.D. Ratajczyk, R.D. Dyer and G.W. Carter // *J Med Chem.* – 1987. – V. 30. – №3. – P. 574-580.

181. Sweeney, P. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies / P. Sweeney, H. Park, M. Baumann, J. Dunlop, J. Frydman, R. Kopito, A. McCampbell, G. Leblanc, A. Venkateswaran, A. Nurmi and R. Hodgson // *Transl Neurodegener.* – 2017. – V. 6. – P. 6.
182. Takahashi-Ito, K. Memantine inhibits beta-amyloid aggregation and disassembles preformed beta-amyloid aggregates / K. Takahashi-Ito, M. Makino, K. Okado and T. Tomita // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2017. – V. 493. – №1. – P. 158-163.
183. Telfer, T.J. Analogues of desferrioxamine B (DFOB) with new properties and new functions generated using precursor-directed biosynthesis / T.J. Telfer, T. Richardson-Sanchez, M.P. Gotsbacher, K.P. Nolan, W. Tieu and R. Codd // *Biometals.* – 2019. – V. 32. – №3. – P. 395-408.
184. Thakur, A. Glioblastoma: Current Status, Emerging Targets, and Recent Advances / A. Thakur, C. Faujdar, R. Sharma, S. Sharma, B. Malik, K. Nepali and J.P. Liou // *J Med Chem.* – 2022. – V. 65. – №13. – P. 8596-8685.
185. Thaler, F. Towards selective inhibition of histone deacetylase isoforms: what has been achieved, where we are and what will be next / F. Thaler and C. Mercurio // *ChemMedChem.* – 2014. – V. 9. – №3. – P. 523-526.
186. Thurn, K.T. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer / K.T. Thurn, S. Thomas, A. Moore and P.N. Munster // *Future Oncol.* – 2011. – V. 7. – №2. – P. 263-283.
187. Tsukamoto, K. Binding of salicylhydroxamic acid and several aromatic donor molecules to *Arthromyces ramosus* peroxidase, investigated by X-ray crystallography, optical difference spectroscopy, NMR relaxation, molecular dynamics, and kinetics / K. Tsukamoto, H. Itakura, K. Sato, K. Fukuyama, S. Miura, S. Takahashi, H. Ikezawa and T. Hosoya // *Biochemistry.* – 1999. – V. 38. – №39. – P. 12558-12568.
188. Tsukanov, V.V. Changes in the indices of prooxidant and antioxidant systems in blood plasma in men with atrophic gastritis and gastric cancer / V.V.

- Tsukanov, O.V. Smirnova, E.V. Kasparov, A.A. Sinyakov, A.V. Vasyutin and Yu.L. Tonkikh // *Ter Arkh.* – 2018. – V. 90. – №2. – P. 24-27.
189. Vaiserman, A.M. Epigenetic drugs: a novel anti-aging strategy? / A.M. Vaiserman and E.G. Pasyukova // *Front Genet.* – 2012. – V. 3. – P. 224.
190. Valko, M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur and J. Telser // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2007. – V. 39. – №1. – P. 44-84.
191. Vorhees, C.V. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory / C.V. Vorhees and M.T. Williams // *Nat Protoc.* – 2006. – V. 1. – №2. – P. 848-858.
192. Vystorop, I.V. Regioselective Synthesis, Structure, and Chemosensitizing Antitumor Activity of Cyclic Hydroxamic Acid Based on DL-Valine / I.V. Vystorop, G.V. Shilov, A.V. Chernyak, E.N. Klimanova, T.E. Sashenkova, S.G. Klochkov, M.E. Neganova, Y.R. Aleksandrova, U.Y. Allayarova and D.V. Mishchenko // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* – 2021. – V. 47. – P. 757-764.
193. Wang, C. The role of mitochondria in apoptosis / C. Wang and R.J. Youle // *Annu Rev Genet.* – 2009. – V. 43. – P. 95-118.
194. Wang, J. Potential advantages of CUDC-101, a multitargeted HDAC, EGFR, and HER2 inhibitor, in treating drug resistance and preventing cancer cell migration and invasion / J. Wang, N.W. Pursell, M.E.S. Samson, R. Atoyan, A.W. Ma, A. Selmi, W. Xu, X. Cai, M. Voi, P. Savagner and C.-J. Lai // *Mol Cancer Ther.* – 2013. – V. 12. – №6. – P. 925-936.
195. Wang, Y. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure / Y. Wang, E. Xu, P.R. Musich and F. Lin // *CNS Neurosci Ther.* – 2019. – V. 25. – №7. – P. 816-824.
196. Ward, R.J. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders / R.J. Ward, F.A. Zucca, J.H. Duyn, R.R. Crichton and L. Zecca // *Lancet Neurol.* – 2014. – V. 13. – №10. – P. 1045-1060.

197. Witt, O. HDAC family: What are the cancer relevant targets? / O. Witt, H.E. Deubzer, T. Milde and I. Oehme // *Cancer Lett.* – 2009. – V. 277. – №1. – P. 8-21.
198. Wolfer, D.P. Extended analysis of path data from mutant mice using the public domain software Wintrack / D.P. Wolfer, R. Madani, P. Valenti and H.P. Lipp // *Physiol Behav.* – 2001. – V. 73. – №5. – P. 745-753.
199. Wu, G. Glutathione metabolism and its implications for health / G. Wu, Y.-Z. Fang, S. Yang, J.R. Lupton and N.D. Turner // *J Nutr.* – 2004. – V. 134. – №3. – P. 489-492.
200. Xu, K. Targeting HDACs: a promising therapy for Alzheimer's disease / K. Xu, X.L. Dai, H.C. Huang and Z.F. Jiang // *Oxid Med Cell Longev.* – 2011. – V. 2011. – P. 143269.
201. Yadav, R. Sialic Acid Hydroxamate: A Potential Antioxidant and Inhibitor of Metal-Induced beta-Amyloid Aggregates / R. Yadav, R.V. Murthy and R. Kikkeri // *Chembiochem.* – 2015. – V. 16. – №10 – P. 1448-1453.
202. Yang, F. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Coumarin-Based Hydroxamate Derivatives as Histone Deacetylase (Hdac) Inhibitors with Antitumor Activities / F. Yang, N. Zhao, J. Song, K. Zhu, C.-S. Jiang, P. Shan and H. Zhang // *Molecules.* – 2019. – V. 24 – P. 14.
203. Yang, S.S. The development prospect of HDAC inhibitors as a potential therapeutic direction in Alzheimer's disease / S.-S. Yang, R. Zhang, G. Wang and Y.-F. Zhang // *Transl Neurodegener.* – 2017. – V. 6 – P. 19.
204. Yang, X.J. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men / X.J. Yang and E. Seto // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2008. – V. 9. – №3 – P. 206-218.
205. Yoon, S. HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases / S. Yoon and G.H. Eom // *Chonnam Med J.* – 2016. – V. 52. – №1 – P. 1-11.
206. You, B.R. Suberoylanilide hydroxamic acid increases anti-cancer effect of tumor necrosis factor-alpha through up-regulation of TNF receptor 1 in lung

- cancer cells / B.R. You, B.R. Han and W.H. Park // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. – №11 – P. 17726-17737.
207. You, B.R. Reactive oxygen species, glutathione, and thioredoxin influence suberoyl bishydroxamic acid-induced apoptosis in A549 lung cancer cells / B.R. You, S.H. Kim and W.H. Park // *Tumour Biol*. – 2015. – V. 36. – №5 – P. 3429-3439.
208. You, B.R. Suberoylanilide hydroxamic acid-induced HeLa cell death is closely correlated with oxidative stress and thioredoxin 1 levels / B.R. You and W.H. Park // *Int J Oncol*. – 2014. – V.44. – №5 – P. 1745-1755.
209. You, B.R. Suberoylanilide hydroxamic acid induces thioredoxin1-mediated apoptosis in lung cancer cells via up-regulation of miR-129-5p / B.R. You and W.H. Park // *Mol Carcinog*. – 2017. – V. 56. – №12 – P. 2566-2577.
210. Yu, Y.C. Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA damage in cellular models of Machado-Joseph disease / Y.-C. Yu, C.-L. Kuo, W.-L. Cheng, C.-S. Liu and M. Hsieh // *J Neurosci Res*. – 2009. – V. 87. – №8 – P. 1884-1891.
211. Yuan, J. Structure of human chromatin-remodelling PBAF complex bound to a nucleosome / J. Yuan, K. Chen, W. Zhang and Z. Chen // *Nature*. – 2022. – V. 605. – №7908. – P. 166-171.
212. Yuan, T.F. The epigenetics changes in Parkinson's disease: a novel therapeutic target / T.F. Yuan, J. Li and C.L. Shan // *CNS Neurosci Ther*. – 2014. – V. 20. – №4. – P. 299-300.
213. Yusufova, N. Histone H1 loss drives lymphoma by disrupting 3D chromatin architecture / N. Yusufova, A. Kloetgen, M. Teater, A. Osunsade, J.M. Camarillo, C.R. Chin, A.S. Doane, B.J. Venters, S. Portillo-Ledesma, J. Conway, J.M. Phillip, O. Elemento, D.W. Scott, W. Béguelin, J.D. Licht, N.L. Kelleher, L.M. Staudt, A.I. Skoultchi, M.-C. Keogh, E. Apostolou, C.E. Mason, M. Imielinski, T. Schlick, Y. David, A. Tsirigos, C.D. Allis, A.A. Soshnev, E. Cesarman and A.M. Melnick // *Nature*. – 2021. – V. 589. – №7841. – P. 299-305.

214. Zagni, C. Hydroxamic Acid-Based Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors Bearing a Pyrazole Scaffold and a Cinnamoyl Linker / C. Zagni, A. Citarella, M. Oussama, A. Rescifina, A. Maugeri, M. Navarra, A. Scala, A. Piperno and N. Micale // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V. 20. – №4.
215. Zhan, P. Medicinal Chemistry Insights into Novel HDAC Inhibitors: An Updated Patent Review (2012-2016) / P. Zhan, X. Wang, X. Liu and T. Suzuki // *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* – 2017. – V. 12. – №1. – P. 16-34.
216. Zhang, J., Using Seahorse Machine to Measure OCR and ECAR in Cancer Cells / J. Zhang and, Q. Zhang // *Methods Mol Biol.* – 2019. – V. 1928. – P. 353-363.
217. Zhang, K. Targeted proteomics for quantification of histone acetylation in Alzheimer's disease / K. Zhang, M. Schrag, A. Crofton, R. Trivedi, H. Vinters and W. Kirsch // *Proteomics.* – 2012a. – V. 12. – №8. – P. 1261-1268.
218. Zhang, X. The discovery of colchicine-SAHA hybrids as a new class of antitumor agents / X. Zhang, J. Zhang, L. Tong, Y. Luo, M. Su, Y. Zang, J. Li, W. Lu and Y. Chen // *Bioorg Med Chem.* – 2013. – V. 21. – №11. – P. 3240-3244.
219. Zhang, X.D. The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate: a potential sensitizer of melanoma to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis / X.D. Zhang, S.K. Gillespie, J.M. Borrow and P. Hersey // *Biochem Pharmacol.* – 2003. – V. 66. – №8. – P. 1537-1545.
220. Zhang, X.H. A Review of Progress in Histone Deacetylase 6 Inhibitors Research: Structural Specificity and Functional Diversity / X.-H. Zhang, Q. Ma, H.-P. Wu, M.Y. Khamis, Y.-H. Li, L.-Y. Ma and H.-M. Liu // *J Med Chem.* – 2021. – V. 64. – №3. – P. 1362-1391.
221. Zhang, Z. Valproic acid-mediated neuroprotection in retinal ischemia injury via histone deacetylase inhibition and transcriptional activation / Z.Z. Zhang, X.H. Qin, N. Tong, X.F. Zhao, Y.Y. Gong, Y. Shi and X.W. Wu // *Exp Eye Res.* – 2012b. – V. 94. – №1. – P. 98-108.

222. Zhao, N. Development of Coumarin-Based Hydroxamates as Histone Deacetylase Inhibitors with Antitumor Activities / N. Zhao, F. Yang, L. Han, Y. Qu, D. Ge and H. Zhang // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – №3.
223. Zhu, M. Histone deacetylase inhibitors prevent mitochondrial fragmentation and elicit early neuroprotection against MPP⁺ / M. Zhu, W.-W. Li and C.-Z. Lu // *CNS Neurosci Ther*. – 2014. – V. 20. – №4. – P. 308-316.