

ОЦЕНКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ МЫШЕЙ ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ 2-(1,1-ДИМЕТИЛ-1Н-БЕНЗО[Е]ИНДОЛИН-2-ИЛ)-5,6,7-ТРИХЛОР-1,3-ТРОПОЛОНА

¹Головинов И.В., ¹Гончарова А.С., ¹Кузнецова Н.С., ¹Галина А.В., ¹Росторгуев Э.Е.,
¹Ходакова Д.В., ¹Шульга А.А., ²Гусаков Е.А., ³Саяпин Ю.А., ¹Димитриади С.Н.

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: ivgolovinov@yandex.ru;

²Научно-исследовательский институт физической и органической химии ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону;

³Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону

В настоящем исследовании оценивались гематологические и биохимические показатели крови мышей линии BALB/c nude при многократном введении 2-(1,1-диметил-1Н-бензо[е]индолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона. Суспензию исследуемого трополона с 1 %-ным крахмальным гелем перорально вводили мышам 3 раза в неделю в течение 4 недель. Животные были разделены на четыре группы – три опытные группы в зависимости от дозы трополона – 10, 20, и 30 мг/кг и четвертую контрольную, которой вводили 1 %-ный крахмальным гель. Изучение эффекта трополона в более высоких дозах оказалось затруднительным из-за невозможности суспендировать требуемое количество вещества в объеме растворителя, установленном для введения лабораторным мышам. Через 28 дней после первого введения вещества образцы крови собирали для анализа с использованием ветеринарного гематологического анализатора Exigo EOS и биохимического анализатора VetScan VS2. Статистически значимых различий по гематологическим или биохимическим показателям между исследуемыми группами не наблюдалось. Результаты показывают, что синтетическое производное трополона хорошо переносится в тестируемых дозах, не оказывая вредного воздействия на ключевые физиологические процессы, о чем свидетельствуют показатели крови. Эти результаты дают ценную информацию о профиле безопасности исследуемого соединения, подтверждая его потенциал для дальнейшей доклинической оценки и разработки в качестве противоопухолевого средства.

Ключевые слова: рак, токсичность, иммунодефицитные мыши, Balb/c nude, трополон, гематологические показатели, биохимические показатели

ASSESSMENT OF HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL BLOOD PARAMETERS OF MICE WITH REPEATED ADMINISTRATION OF 2-(1,1-DIMETHYL-1H-BENZO[E]INDOLIN-2-YL)-5,6,7-TRICHLORO-1,3-TROPOLONE

¹Golovinov I.V., ¹Goncharova A.S., ¹Kuznetsova N.S., ¹Galina A.V., ¹Rostorguev E.E.,
¹Khodakova D.V., ¹Shulga A.A., ²Gusakov E.A., ³Sayapin Yu.A., ¹Dimitriadi S.N.

¹National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: ivgolovinov@yandex.ru;

²Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Rostov-on-Don;

³Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don

The present study evaluated hematological and biochemical blood parameters of BALB/c nude mice after repeated administration of 2-(1,1-dimethyl-1H-benzo[e]indolin-2-yl)-5,6,7-trichloro-1,3-tropolone. A suspension of the studied tropolone with 1 % starch gel was orally administered to mice 3 times a week for 4 weeks. The animals were divided into 3 experimental groups depending on the dose of the studied tropolone – 10, 20 and 30 mg/kg and into the 4th control group, which received 1 % starch gel. Studying the effect of tropolone at a higher dose proved difficult due to the inability to suspend the required amount of the substance in the volume established for administration to laboratory mice. 28 days after the first administration of the substance, blood samples were collected for analysis using an Exigo EOS veterinary hematology analyzer and a VetScan VS2 chemistry analyzer. There were no statistically significant differences in hematological or biochemical parameters between the study groups. The results show that the synthetic tropolone derivative was well tolerated at the tested doses, without adversely affecting key physiological processes as measured by blood parameters. These results provide valuable information on the safety profile of the investigational compound, supporting its potential for further preclinical evaluation and development as an anticancer agent.

Keywords: cancer, toxicity, immunodeficient mice, Balb/c nude, tropolone, hematological parameters, biochemical parameters

Неустанный поиск новых терапевтических средств лечения рака остается первостепенной задачей современных фармакологических исследований. В условиях растущей распространенности и сложности случаев этого серьезного заболевания существует острая необходимость в инновационных методах лечения, которые могут эффективно воздействовать на злокачественные новообразования с минимальным влиянием на здоровые ткани. В этом контексте исследование природных и синтетических соединений с потенциальными противоопухолевыми свойствами открывает большие перспективы для разработки новых терапевтических стратегий [1].

Трополоны – класс органических соединений, характеризующихся уникальным структурным каркасом, привлекли внимание для фармакологических исследований. Особый интерес представляет потенциал синтетических производных трополона, которые проявляют улучшенные фармакокинетические свойства и целевую специфичность по сравнению с их природными аналогами [2, 3]. Например, показано, что производные циклических аминотропониминов обладают противоопухолевой активностью в отношении ксенографтов культуры рака молочной железы 4T1 на мышах линии Balb/C [4]. Кроме того, сообщается, что синтетические α -замещенные трополоны проявляют выраженный цитотоксический эффект на трех клеточных линиях миеломы [5].

Понимание влияния производных трополонового ряда на биохимические и гематологические показатели крови важно для выяснения их терапевтического потенциала и профиля безопасности. Будучи неотъемлемыми компонентами системной физиологии, параметры крови служат чувствительными индикаторами физиологических нарушений, вызываемых фармакологическими агентами. Более того, учитывая сложное взаимодействие между патофизиологией рака и гематологическими биомаркерами, оценка производных трополона как по биохимическим, так и по гематологическим параметрам крови является актуальной для онкологических исследований [6].

Выяснение системного влияния производных трополонового ряда на ключевые физиологические процессы будет способствовать более широкому пониманию их фармакологического профиля и потенциального терапевтического применения при лечении рака.

Цель исследования – оценка гематологических и биохимических показателей крови мышей линии Balb/C nude при многократном введении 2-(1,1-диметил-1H-бензо[e]индолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона.

Материалы и методы исследования

Исследуемое соединение, 2-(1,1-диметил-1H-бензо[e]индолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополон (далее Ю-122(2)), было синтезировано в НИИ физической и органической химии

Южного федерального университета методом реакции расширения *o*-хинонового цикла [7]. Вещество относится к новым соединениям в ряду 2-гетарил-1,3-трополонов.

Исследуемое вещество представляет собой порошок оранжевого цвета. Оно оказалось слабо растворимым в воде, поэтому его предварительно растворяли в 50 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). В качестве носителя Ю-122(2), растворенного в ДМСО, использовали 1 %-ный крахмальный гель. Полученную суспензию готовили *ex tempore* и вводили каждому животному перорально с помощью зонда в объеме 0,2 мл 3 раза в неделю в течение 4 недель.

Исследование проводилось на 28 самках мышей линии Balb/c nude (20–25 г), поскольку данное соединение с потенциальным противоопухолевым эффектом может исследоваться на ксенографтах, созданных на иммунодефицитных мышах, которые считаются более чувствительными к такому воздействию. Животные в возрасте 5–6 недель были получены из питомника ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск) и далее содержались в индивидуально вентилируемых клетках (IVC) системы Tecniplast (Италия) при температуре окружающей среды 21–23 °С и относительной влажности 50–60 %, с циклом день/ночь 12:12 и неограниченным доступом к корму и воде. Все экспериментальные протоколы были одобрены биоэтической комиссией ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России.

Животные были разделены на 4 группы в зависимости от примененной дозы трополона (табл. 1).

Таблица 1

Распределение мышей по группам в эксперименте

Номер группы	Название группы	Количество животных	Вводимое вещество	Доза вещества, мг/кг
1	Опытная	7	Трополон	10
2		7		20
3		7		30
4	Контрольная	7	Крахмальный гель	1 %

Изучение эффекта Ю-122(2) в более высокой дозе оказалось затруднительным из-за невозможности суспендировать количество вещества, требуемое для приготовления доз, превышающих 30 мг/кг в объеме растворителя, установленном для введения лабораторным мышам.

По истечении 28 дней животных подвергали эвтаназии путем декапитации, после чего проводился забор крови. Поскольку цель исследования токсичности при многократном

введении заключается в оценке кумулятивного эффекта тестируемого вещества, забор образцов крови в конце исследования предоставляет информативные данные о совокупном воздействии вещества, что позволяет получить ясное представление о его потенциальной токсичности. Для изучения эффектов исследуемого соединения на мышей линии Balb/c nude при его многократном приеме оценивали гематологические и биохимические показатели крови, которые определялись с использованием гемоанализатора Exigo EOS vet (Boule Medical A.B., Швеция) и биохимического анализатора VetScanVS2 (ABAXIS Inc., Германия).

Все данные выражены в виде среднего значения $\pm S_D$. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Statistica 10.0. Применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и оценивали вариабельность показателей (коэффициент вариации, cv). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Гематологический анализ играет важную роль в изучении токсичности различных лекарственных веществ, включая синтетические соединения [8]. В данном исследовании авторы сфокусировались на оценке влияния синтетического производного трополона на различные параметры крови у мышей, включая количество эритроцитов (RBC), их средний корпускулярный объем (MCV) и ширину распределения (RDW), гематокрит (HCT), количество тромбоцитов (PLT) и их средний объем (MPV), количество лейкоцитов (WBC), концентрацию гемоглобина (HGB), средний корпускулярный гемоглобин (MCH) и его среднюю концентрацию (MCHC), а также процентное содержание лимфоцитов (LYM), гранулоцитов (GRAN) и моноцитов (MONO).

Результаты оценки гематологических показателей крови иммунодефицитных мышей линии Balb/C nude при многократном введении 2-(1,1-диметил-1H-бензо[e]индолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополона представлены в табл. 2.

Таблица 2

Гематологические показатели крови у мышей линии Balb/C nude при пероральном введении исследуемого трополона в течение 28 дней

Гематологические показатели	Группы				p
	Группа 1 (n = 7; 10 мг/кг)	Группа 2 (n = 7; 20 мг/кг)	Группа 3 (n = 7; 30 мг/кг)	Группа 4 (n = 7; 1 % крахмальный гель)	
RBC, $10^{12}/л$ (cv)	6,22 \pm 0,62 (9,92 %)	5,90 \pm 0,69 (11,70 %)	5,90 \pm 0,42 (7,09 %)	5,56 \pm 0,24 (4,25 %)	0,34

MCV, фл (cv)	46,71±1,29 (2,76 %)	47,03±0,66 (1,40 %)	47,45±1,88 (3,97 %)	46,47±1,35 (2,90 %)	0,69
RDW, % (cv)	18,23±1,45 (7,94 %)	18,77±1,21 (6,47 %)	17,83±2,36 (13,24 %)	18,45±2,34 (12,71 %)	0,85
RDWa, фл (cv)	28,90±1,95 (6,73 %)	29,95±1,78 (5,94 %)	29,10±4,59 (15,77 %)	28,70±3,63 (12,63 %)	0,92
HCT, % (cv)	29,03±2,63 (9,05 %)	27,75±3,13 (11,28 %)	27,97±1,90 (6,79 %)	25,87±1,40 (5,39 %)	0,29
PLT, 10 ⁹ /л (cv)	851,17±315,37 (37,05 %)	919,50±330,68 (35,96 %)	658,50±230,34 (34,98 %)	968,75±220,02 (22,71 %)	0,32
MPV, фл (cv)	6,68±0,58 (8,75 %)	6,55±0,50 (7,77 %)	6,75±0,28 (4,16 %)	6,77±0,29 (4,24 %)	0,84
WBC, 10 ⁹ /л (cv)	46,62±35,62 (76,42 %)	38,84±23,31 (60,02 %)	51,44±23,75 (46,18 %)	56,63±28,47 (50,27 %)	0,83
HGB, г/л (cv)	102,17±9,79 (9,58 %)	98,83±11,86 (12,00 %)	99,17±6,76 (6,82 %)	94,50±3,87 (4,10 %)	0,63
MCH, пг (cv)	16,45±0,45 (2,71 %)	16,73±0,33 (1,95 %)	16,88±1,06 (6,26 %)	17,05±0,88 (5,17 %)	0,60
MCHC, г/л (cv)	352,50±4,76 (1,35 %)	356,00±5,51 (1,55 %)	355,33±8,94 (2,52 %)	366,50±13,28 (3,62 %)	0,09
LYM, % (cv)	17,52±2,25 (12,85 %)	15,80±1,56 (9,88 %)	16,22±3,74 (23,07 %)	15,23±2,98 (19,60 %)	0,58
GRA, % (cv)	69,67±2,86 (4,10 %)	70,56±11,03 (15,63 %)	69,44±3,39 (4,88 %)	71,80±6,39 (8,90 %)	0,96
MON, % (cv)	14,25±1,79 (12,54 %)	14,10±1,46 (10,37 %)	14,74±1,3 (8,83 %)	14,20±1,63 (11,50 %)	0,92
LYM %/MON %	1,25±0,28 (22,20 %)	1,13±0,14 (12,24 %)	1,11±0,30 (26,91 %)	1,07±0,15 (14,01 %)	0,61

Результаты не показали статистически значимых различий ни по одному из гематологических показателей между исследуемыми группами. Полученные данные позволяют предположить, что исследуемое соединение в тестируемых дозах не оказывает токсического воздействия на кроветворную систему. Каждый из анализируемых параметров дает представление о различных аспектах здоровья и функциях крови, а отсутствие значительных изменений свидетельствует о сохранении функций органов кроветворения.

Биохимический анализ был проведен для оценки влияния синтетического производного трополона на различные показатели крови самок мышей линии BALB/c nude. Показатели, включая альбумин (ALB), щелочную фосфатазу (ALP), аланинаминотрансферазу (ALT), амилазу (AMY), общий билирубин (TBIL), азот мочевины крови (BUN), общий кальций (CA), фосфор (PHOS), креатинин (CRE), глюкозу (GLU), натрий (NA⁺), общий белок (TP) и глобулин (GLOB), оценивали через 28 дней многократного перорального введения JO-122(2) в дозах 10, 20 и 30 мг/кг массы тела.

Результаты не выявили существенных различий ни по одному из биохимических параметров между исследуемыми группами по сравнению с контрольной (табл. 3). Это указывает на то, что исследуемый трополон не вызывал заметных изменений биохимических показателей крови в тестируемых дозах.

Таблица 3

Биохимические показатели крови у мышей линии Balb/C nude при пероральном введении исследуемого трополона в течение 28 дней

Биохимические показатели	Группы				p
	Группа 1 (n = 7; 10 мг/кг)	Группа 2 (n = 7; 20 мг/кг)	Группа 3 (n = 7; 30 мг/кг)	Группа 4 (n = 7; 1 % крахмальный гель)	
ALB, г/дл (cv)	1,53±0,43 (27,87 %)	1,50±0,34 (22,44 %)	1,53±0,48 (31,32 %)	1,55±0,29 (18,62 %)	1,00
ALP, ед/л (cv)	20,50±3,83 (18,70 %)	19,25±0,96 (4,97 %)	22,17±5,23 (23,60 %)	16,00±3,37 (21,04 %)	0,14
ALT, ед/л (cv)	25,67±2,06 (8,05 %)	25,33±1,15 (4,56 %)	25,12±2,81 (10,49 %)	24,33±2,89 (11,86 %)	0,88
AMY, ед/л (cv)	495,17±75,00 (15,15 %)	483,33±49,41 (10,22 %)	499,60±106,35 (21,29 %)	491,00±61,88 (12,60 %)	1,00
TBIL, мг/дл (cv)	0,33±0,05 (15,49 %)	0,30 (0 %)	0,30 (0 %)	0,35±0,10 (28,57 %)	0,39
BUN, мг/дл (cv)	20,67±3,61 (17,49 %)	22,60±0,75 (3,34 %)	21,67±4,63 (21,38 %)	19,0±1,82 (9,61 %)	0,55
CA, мг/дл (cv)	<4 (0 %)	<4 (0 %)	<4 (0 %)	<4 (0 %)	-

PHOS, мг/дл (cv)	6,23±0,29 (4,72 %)	6,87±1,02 (14,85 %)	6,17±0,34 (5,51 %)	6,93±0,93 (13,40 %)	0,26
CRE, мг/дл (cv)	0,50±0,10 (20,00 %)	0,45±0,13 (28,69 %)	0,50±0,10 (20,00 %)	0,45±0,13 (28,69 %)	0,83
GLU, мг/дл (cv)	98,17±9,79 (9,97 %)	73,97±37,42 (50,59 %)	103,50±15,47 (14,95 %)	62,25±46,52 (74,73 %)	0,11
NA+, ммоль/л (cv)	167,67±2,58 (1,54 %)	165,35±2,46 (1,49 %)	167,20±2,59 (1,54 %)	165,00±2,16 (1,31 %)	0,30
TP, г/дл (cv)	6,02±0,41 (6,76 %)	6,12±0,33 (5,39 %)	5,93±0,40 (6,80 %)	6,02±0,44 (7,34 %)	0,90
GLOB, г/дл (cv)	4,45±0,65 (14,68 %)	4,50±0,70 (15,61 %)	4,42±0,68 (15,52 %)	4,45±0,77 (17,36 %)	1,00

Отсутствие значительных изменений биохимических параметров подчеркивает благоприятный профиль безопасности соединения и требует продолжения исследований его терапевтического потенциала.

Токсичность трополонов может существенно различаться в зависимости от конкретного соединения и его концентрации. Было обнаружено, что некоторые производные трополона обладают низкой токсичностью, что делает их пригодными для дальнейшей оценки противоопухолевых свойств. Например, дигидрофураноаллоколхициноиды показали относительно низкую острую токсичность у мышей при внутривенном введении ($LD_{50} \geq 10$ мг/кг) [9].

Однако другие производные трополона могут проявлять более высокий уровень токсичности, что может ограничивать их терапевтическое использование [10]. Диапазон токсичности среди различных соединений трополона подчеркивает важность тщательной доклинической оценки для установления профилей безопасности для каждого конкретного производного.

Заключение

В этом исследовании авторы оценивали гематологические и биохимические показатели крови у самок мышей линии BALB/c nude после многократного перорального введения синтетического производного трополона. Результаты показывают, что исследуемый трополон, введенный в дозах 10, 20 и 30 мг/кг массы тела, не вызывал существенных изменений ни в одном из оцениваемых гематологических или биохимических параметров после 28 дней первого приема исследуемого трополона при его пероральном введении 3 раза в неделю в течение 4 недель.

Данные гематологического исследования позволяют предположить, что соединение не вызывает гематотоксичности и поддерживает нормальные функции и количество клеток крови. Аналогично неизменные уровни биохимических маркеров указывают на то, что соединение, вероятно, не оказывает гепатотоксического, нефротоксического или панкреатотоксического действия и не нарушает обменные процессы.

Результаты проведенного исследования предоставляют ценную информацию о профиле безопасности синтетического производного трополона, поддерживая его потенциал для дальнейшей доклинической оценки и разработки в качестве противоракового средства. Отсутствие значительных побочных эффектов на критические физиологические процессы подчеркивает перспективность этого соединения в качестве терапевтического кандидата. Будущие исследования должны быть сосредоточены на выяснении механизмов действия, оптимизации режимов дозирования и оценке долгосрочной безопасности и эффективности этого многообещающего соединения.

Список литературы

1. Sofi F.A., Tabassum N. Natural product inspired leads in the discovery of anticancer agents: an update // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2023. Vol. 41, Is. 17. P. 8605–8628. DOI: 10.1080/07391102.2022.2134212.
2. Кит О.И., Минкин В.И., Лукбанова Е.А., Саяпин Ю.А., Гусаков Е.А., Ситковская А.О., Филиппова С.Ю., Комарова Е.Ф., Волкова А.В., Ходакова Д.В., Миндарь М.В., Лазутин Ю.Н., Енгибарян М.А., Колесников В.Е. Оценка цитотоксической активности и токсичности производного трополонов с потенциальным противоопухолевым действием // *Бюллетень сибирской медицины*. 2022. Т. 21. № 2. С. 60–66. DOI: 10.20538/1682-0363-2022-2-60-66.
3. Комарова Е.Ф., Лукбанова Е.А., Дженкова Е.А., Гончарова А.С., Заикина Е.В., Гурова С.В., Галина А.В., Курбанова Л.К., Миндарь М.В., Ходакова Д.В., Гусарева М.С., Зинькович М.С. Иммуногистохимическая оценка возможных механизмов противоопухолевого действия 2-(6, 8-диметил-5-нитро-4-хлорхинолин-2-ил)-5, 6, 7-трихлор-1, 3-трополона на PDX-моделях рака легкого // *Южно-российский онкологический журнал*. 2023. Т. 4. № 1. С. 6–13. DOI: 10.37748/2686-9039-2023-4-1-1.
4. Palai B.B., Patel S.A., Sharma N.K., Dixit M. One-pot synthesis of cyclic-aminotropiminium carboxylate derivatives with DNA binding and anticancer properties // *Communications Chemistry*. 2022. Vol. 5, Is. 1. P. 179. DOI: 10.1038/s42004-022-00798-x.
5. Haney S.L., Allen C., Varney M.L., Dykstra K.M., Falcone E.R., Colligan S.H., Hu Q., Aldridge A.M., Wright D.L., Wiemer A.J., Holstein S.A. Novel tropolones induce the unfolded

protein response pathway and apoptosis in multiple myeloma cells // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, Is. 44. P. 76085–76098. DOI: 10.18632/oncotarget.18543.

6. Bensam M., Rechreche H., Abd-Elwahab A.E., Ali S.M. Study of the hematological, physiological, and histological parameters changes of an *Ephedra alata* ethanolic extract in female mice // *South African Journal of Botany*. 2023. Vol. 160. P. 347–353. DOI: 10.1016/j.sajb.2023.07.012.

7. Минкин В.И., Кит О.И., Саяпин Ю.А., Максимов А.Ю., Гончарова А.С., Гусаков Е.А., Тупаева И.О., Красникова Т.А., Кузнецова Н.С., Филиппова С.Ю., Чембарова Т.В. 2-(1,1-Диметил-1Н-бензо[е]индолин-2-ил)-5,6,7-трихлор-1,3-трополон, обладающий цитотоксической активностью по отношению к культуре клеток рака кожи А431 и рака легкого Н1299 // Патент РФ № 2810581. Патентообладатель ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. 2023. Бюл. № 36.

8. Iqbal A., Syed M.A., Haque M.M., Najmi A.K., Ali J., Haque S.E. Effect of nerolidol on cyclophosphamide-induced bone marrow and hematologic toxicity in Swiss albino mice // *Experimental Hematology*. 2020. Vol. 82. P. 24–32. DOI: 10.1016/j.exphem.2020.01.007.

9. Shchegravina E.S., Svirshchevskaya E.V., Combes S., Allegro D., Barbier P., Gigant B., Varela P.F., Gavryushin A.E., Kobanova D.A., Shchekotikhin A.E., Fedorov A.Yu. Discovery of dihydrofuranoallicolchicinoids-highly potent antimetabolic agents with low acute toxicity // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 207. P. 112724. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112724.

10. Saito R., Sennari G., Nakajima A., Kimishima A., Iwatsuki M., Ishiyama A., Hokari R., Hirose T., Sunazuka T. Discoveries and syntheses of highly potent antimalarial troponoids // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2021. Vol. 69, Is. 6. P. 564–572. DOI: 10.1248/cpb.c21-00132