

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-3-50-60>

Влияние цифетрилина на экспрессию рецепторов к соматостатину в перевиваемой опухоли Ca-755 мышей

М.П. Киселева, Л.М. Борисова, В.В. Делекторская, З.С. Шпрах, С.В. Устинкина, И.Ю. Кубасова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Марина Петровна Киселева marina-kiselyova@mail.ru

Введение. Оценка экспрессии рецепторов к соматостатину (somatostatin receptors, SSTRs) в опухолевых клетках необходима для обоснованного применения направленной на такие рецепторы терапии.

Цель исследования – определение сродства оригинального аналога соматостатина цифетрилина к SSTRs перевиваемой аденокарциномы молочной железы Ca-755 мышей.

Материалы и методы. Цифетрилин синтезирован в лаборатории химического синтеза Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Цифетрилин в лекарственной форме в виде таблеток вводили перорально в терапевтической дозе 10 мг/кг в течение 7 дней мышам-самкам F1 (C57Bl/6 × DBA/2) с привитой опухолью Ca-755. Животным контрольной группы цифетрилин не вводили. Образцы опухолевой ткани получали от животных на 9-й и 14-й дни после трансплантации Ca-755 и направляли на иммуногистохимическое исследование, которое проводили на серийных парафиновых срезах иммунопероксидазным методом с использованием первичных антител к различным типам SSTRs.

Результаты. В опухолевых образцах от животных контрольной группы показана высокая частота встречаемости положительной экспрессии SSTR1, SSTR2 и SSTR5 (в 80, 100 и 100 % опухолевых образцов соответственно). В результате введения цифетрилина в опухолевых образцах, полученных на 9-й день после перевивки Ca-755, обнаружено изменение рецепторного статуса опухоли в сторону уменьшения уровня экспрессии SSTR2 (80 % образцов) и SSTR5 (60 % образцов); экспрессия SSTR1 не изменилась (80 % образцов). При сравнении с контролем в опухолевых образцах от животных, которым вводили цифетрилин, полученных на 14-й день после трансплантации Ca-755, отмечено понижение уровня экспрессии SSTR2 (80 % образцов), SSTR1 и SSTR5 (по 60 % образцов соответственно) вследствие связывания цифетрилина с SSTRs опухолевых клеток. SSTR3 и SSTR4 не демонстрировали высокого уровня положительной экспрессии в исследованных образцах опухоли Ca-755.

При иммуногистохимическом окрашивании клеток Ca-755 антителами к SSTRs зафиксирована тенденция к снижению количества антигенпозитивных клеток с 15–50 % в контроле до 10–40 % на 9-й день после перевивки Ca-755 и до 10–30 % на 14-й день после перевивки Ca-755.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о наличии в перевиваемой аденокарциноме молочной железы Ca-755 мышей высокого уровня экспрессии SSTR1, SSTR2 и SSTR5, за счет связывания с которыми реализуется прямое противоопухолевое действие цифетрилина.

Ключевые слова: аналог соматостатина цифетрилин, рецепторы к соматостатину, перевиваемые опухоли мышей, иммуногистохимический анализ

Для цитирования: Киселева М.П., Борисова Л.М., Делекторская В.В. и др. Влияние цифетрилина на экспрессию рецепторов к соматостатину в перевиваемой опухоли Ca-755 мышей. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):50–60. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-50-60

Cyphetrylin effect on somatostatin receptors expression in transplantable Ca-755 mice tumor

Marina P. Kiseleva, Larisa M. Borisova, Vera V. Delektorskaya, Zoya S. Shprakh, Svetlana V. Ustinkina, Irina Yu. Kubasova

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia

Contacts: Marina Petrovna Kiseleva marina-kiselyova@mail.ru

Background. Expression evaluation of somatostatin receptors (SSTRs) in tumor cells is necessary for the reasonable use of therapy directed at such receptors.

Aim. The affinity determination of the original analogue of somatostatin cyphetrylin for SSTRs of transplanted mice mammary adenocarcinoma Ca-755.

Materials and methods. Cyphetrylin was synthesized in the Chemical Synthesis Laboratory of the Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia. Cyphetrylin in tablet form was administered orally at a therapeutic dose of 10 mg/kg for 7 days to female F1 (C57Bl/6 × DBA/2) tumor-grafted Ca-755 mice. Animals of the control group were not administered with cyphetrylin. Tumor tissue samples were obtained from animals on the 9th and 14th days after Ca-755 transplantation and sent for immunohistochemical study, which was performed on serial paraffin sections by the immunoperoxidase method using primary antibodies to various types of SSTRs.

Results. The high frequency of positive expression of SSTR1, SSTR2, and SSTR5 (in 80, 100 and 100 % of tumor samples, respectively) was shown in tumor samples of the control group animals. As a result of cyphetrylin introduction in tumor samples obtained on the 9th day after Ca-755 inoculation, a change in the tumor receptor status was found towards a decrease in the level of expression of SSTR2 (80 % of samples) and SSTR5 (80 % of samples); SSTR1 expression did not change (80 % of samples). Compared to the controlled, in tumor samples after cyphetrylin administration, obtained on day 14 from Ca-755 transplantation, a decrease in the expression level of SSTR2 (80 % of samples), SSTR1 and SSTR5 (60 % of samples for SSTR each type) was noted, due to cyphetrylin binding to SSTRs of tumor cells. The receptors SSTR3 and SSTR4 did not show a high level of expression in the studied Ca-755 tumor samples.

Immunohistochemical staining of Ca-755 cells with antibodies to SSTRs showed a tendency to reduction of antigen-positive cells number from 15–50 % in control to 10–40 % on day 9 after Ca-755 transplantation and 10–30 % on day 14 after Ca-755 transplantation.

Conclusion. The data obtained indicates the presence in mice transplanted mammary adenocarcinoma Ca-755 of SSTR1, SSTR2 and SSTR5 high level expression due to the binding to which the direct cyphetrylin antitumor effect is realized.

Keywords: somatostatin analogue cyphetrylin, somatostatin receptors, transplantable mouse tumors, immunohistochemical analysis

For citation: Kiseleva M.P., Borisova L.M., Delektorskaya V.V. et al. Cyphetrylin effect on somatostatin receptors in transplantable Ca-755 mice tumor. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(3):50–60. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-50-60

Введение

Соматостатин секретируется в нервной системе и периферических органах человека и позвоночных животных. В нервной ткани он осуществляет роль нейротрансмиттера, в периферических органах и тканях действует как ингибитор секреторных процессов через специфические мембранные белки-рецепторы [1–3].

Одной из важных функций соматостатина является контроль и регуляция пролиферации клеток как при нормальных, так и при патологических состояниях, включая опухоли гипофиза, поджелудочной железы, молочной железы, нейроэндокринные новообразования [4–6]. Антипролиферативные эффекты соматостатина основаны на непрямом регуляторном действии и реализуются через ингибирование повышенной выработки опухолевыми клетками факторов роста и ангиогенеза [7]. Прямой антипролиферативный эффект соматостатина заключается в связывании с семью трансмембранными G-белковыми рецепторами (GPCR), а именно с рецепторами к соматостатину (somatostatin receptors, SSTRs) 1–5-го типов (SSTR1–5), которые содержат 7 доменов (трансмембранных спиралей), пронизывающих мембрану.

Этот прямой эффект соматостатина вызывает остановку клеточного цикла и/или апоптоз [8–10]. Подтипы SSTR1–5 изменчиво экспрессируются в различных опухолях человека, крыс, мышей и имеют прогностическое значение [11–13]. SSTRs представлены в первичных опухолях и их метастазах [14, 15].

Так как клиническое применение нативного соматостатина ограничено его коротким временем полужизни (примерно 2 мин) в плазме крови, для лечения новообразований используют синтетические аналоги соматостатина с укороченными полипептидными цепями, образующими прочные связи с SSTRs, локализованными на поверхностной мембране клеток тканей-мишеней. Действие аналогов соматостатина обусловлено сродством к SSTRs. Результатом связывания соматостатина и его аналогов с рецепторами является ингибирование выброса регуляторных пептидов из гипофиза, тонкого кишечника, поджелудочной железы, прямое подавление действия гормона роста на клетки-мишени, в том числе на опухолевые клетки [10, 11, 16]. Для аналогов соматостатина установлен различный аффинитет к соответствующим рецепторам. Так, известный аналог соматостатина октреотид взаимодействует с SSTR2 и SSTR5

и очень незначительно — с SSTR3 [17–19]. Другой циклогексапептидный аналог соматостатина пасиреотид обладает высокой аффинностью и комплексируется с 4 из 5 известных SSTRs (SSTR1, 2, 3 и 5) [20–23]. Результаты определения аффинности связывания природного соматостатина (SRIF-14) и его аналогов — октреотида, ланреотида и пасиреотида — с 5 разными типами SSTRs человека (SSTR1–5) представлены в табл. 1.

Высокий уровень экспрессии SSTRs в опухоли открывает возможности для лечения ряда новообразований с помощью аналогов соматостатина [24–26]. Чтобы оценить возможность применения терапии, направленной на SSTRs, необходимо определить выраженность экспрессии различных типов SSTRs в опухолевых клетках [27, 28]. В настоящей работе представлены результаты исследования SSTRs при применении оригинального отечественного аналога соматостатина цифетрилина [29–31].

Цель исследования — определение сродства оригинального аналога соматостатина цифетрилина к SSTRs перевиваемой аденокарциномы молочной железы Ca-755 мышей.

Материалы и методы

В данной работе с помощью иммуногистохимического (ИГХ) метода проведено исследование статуса SSTRs в ткани экспериментальной опухоли аденокарциномы молочной железы Ca-755 мышей с последующим сравнительным анализом уровня экспрессии SSTR1–5 в контрольной группе животных и в группах животных после введения цифетрилина.

Экспрессию SSTRs изучали в образцах аденокарциномы молочной железы Ca-755, которую получали из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «Национальный

медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [32].

Использовали 3-ю генерацию Ca-755, которую перевивали мышам-самкам гибридов F1 (C57Bl/6 × DBA/2) массой тела 18–22 г подкожно по 0,5 мл опухолевой суспензии в правую подмышечную впадину. Штамм поддерживали на мышах-самках линии C57Bl/6 [32].

Цифетрилин — пентапептидный аналог соматостатина — синтезировали в лаборатории химического синтеза Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Лекарственную форму цифетрилина (таблетки 6 мг) растирали, растворяли в 6 мл крахмального клейстера (концентрация цифетрилина 1 мг/мл) и через 72 ч после перевивки Ca-755 вводили мышам ежедневно перорально в терапевтической дозе 10 мг/кг (0,18–0,22 мл/мышь) в течение 7 дней. Группы животных формировали с учетом получения достаточного количества опухолевого материала — образцов для ИГХ-анализа. В эксперимент включили контрольную и 2 опытные группы по 5 животных в каждой. Опухоли контрольной группы росли до 9-го дня. В опытных группах на 9-й день после перевивки, через 1,5 ч после последнего введения цифетрилина, и на 14-й день, через 96 ч после последнего введения цифетрилина, опухоли вырезали и помещали в 10 % забуференный раствор формалина (pH 7,2). Опухолевый материал контрольной группы фиксировали так же. Затем образцы опухолевой ткани обезвоживали проводкой по спиртам и ксилолам, заливали в парафин и готовили серийные срезы толщиной 3–5 мкм, которые наносили на стекла с адгезивным покрытием (Polysine

Таблица 1. Аффинитет соматостатина (SRIF-14) и его аналогов к соматостатиновым рецепторам (SSTRs)

Table 1. Affinity of somatostatin (SRIF-14) and its analogs for somatostatin receptors (SSTRs)

Соматостатин и его аналоги Somatostatin and its analogs	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Соматостатин (SRIF-14) Somatostatin (SRIF-14)	0,93 ± 0,12	0,15 ± 0,02	0,56 ± 0,17	1,5 ± 0,4	0,29 ± 0,04
Октреотид Octreotide	280 ± 80	0,38 ± 0,08	7,1 ± 1,4	>1000	6,3 ± 1,0
Ланреотид Lanreotide	180 ± 20	0,54 ± 0,08	14 ± 9	230 ± 40	17 ± 5
Пасиреотид Pasireotide	9,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,3	>100	0,16 ± 0,01

Примечание. Показаны средние значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}), выраженные в нмоль/л, с учетом стандартной ошибки среднего значения.

Note. Mean half-maximal inhibition concentrations (IC_{50}), expressed in nmol/l, taking into account the standard error of the mean.

Таблица 2. Характеристика использованных в исследовании первичных антител

Table 2. Characteristic of the primary antibodies used in the study

Антитела Antibodies	Клон Clone	Производитель Manufacturer	Разведение Dilution
SSTR1	Polyclonal Rb	Abbiotec, США Abbiotec, USA	1:250
SSTR2	UMB1 (monoclonal Rb)	Epitomics, США Epitomics, USA	1:250
SSTR3	Polyclonal Rb	Thermo, США Thermo, USA	1:1500
SSTR4	Polyclonal Rb	Thermo, США Thermo, USA	1:1500
SSTR5	UMB4 (monoclonal Rb)	Epitomics, США Epitomics, USA	1:250

Таблица 3. Система оценки экспрессии различных типов рецепторов к соматостатину

Table 3. System for assessing the expression of various types of somatostatin receptors

Оценка интенсивности окрашивания Scoring of staining intensity	Интенсивность и процент окрашенных опухолевых клеток Intensity and percentage of stained tumor cells
0	Нет окрашивания или мембранное окрашивание <10 % опухолевых клеток No staining or membrane staining <10 % of tumor cells
1+	Слабое окрашивание мембран >10 % опухолевых клеток Weak membrane staining >10 % tumor cells
2+	Неполное окрашивание мембран, умеренное или сильное окрашивание >10 % опухолевых клеток Incomplete membrane staining, moderate or strong staining >10 % of tumor cells
3+	Полное окрашивание мембран, умеренное или сильное окрашивание >10 % опухолевых клеток Complete membrane staining, moderate to strong staining >10 % of tumor cells

Menzel-Glaser, Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. ИГХ-определение экспрессии SSTRs в образцах опухоли Са-755 мышей проводили на серийных парафиновых срезах с помощью иммунопероксидазного метода с применением первичных антител к различным типам рецепторов [33]. Используемые в исследовании антитела представлены в табл. 2.

Срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной схеме [33]. Для демаскировки антигенов проводили предварительную обработку парафиновых срезов в водяной бане в течение 40 мин при 95 °С с использованием восстанавливающего раствора pH 6,0 (Labvision, США) с последующим охлаждением в течение 20 мин. Срезы инкубировали с первичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации реакции использовали стандартный набор реагентов UltraVision ONE

Detection System (Labvision, США). Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера. Контрольный срез оставляли без первой инкубации. В качестве положительного контроля использовали парафиновые срезы ткани поджелудочной железы мышей-самок линии C57Bl/6.

Оценку реакции в опухоли проводили полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антигенпозитивных клеток (табл. 3). Для каждого антигена учитывали мембранный тип специфического окрашивания.

Наличие >10 % положительно окрашенных клеток опухоли Са-755 позволяло прогнозировать положительный рецепторный уровень, который определял возможность применения цифетрилина в эксперименте. Напротив, отсутствие окрашивания отражало недостаточную экспрессию SSTRs в опухоли, а наличие 1–10 % слабоокрашенных клеток

свидетельствовало об отсутствии убедительных данных об экспрессии достаточного количества рецепторов для терапии.

Результаты

ИГХ-исследование экспрессии SSTR1–5

в контрольной группе

Оценка результатов ИГХ-реакции, основанная на подсчете фракции клеток с мембранной позитивностью в опухолях контрольной группы, представлена в табл. 4.

В 5 образцах опухолей контрольной группы наиболее выраженную ИГХ-реакцию (2+/3+) наблюдали с антителами к SSTR1, SSTR2 и SSTR5: 40 % (2/5), 60 % (3/5) и 80 % (4/5) соответственно. SSTR3 и SSTR4 демонстрировали низкий уровень иммунореактивности в образцах опухолей Ca-755: экспрессию 1+ отмечали в 80 % (4/5) образцов при окраске антителами к SSTR3; самый низкий уровень экспрессии в 40 % (2/5) образцов опухоли показали SSTR4 (2 образца – 1+, 3 образца – 0).

Таким образом, в опухолях контрольной группы отмечали высокую частоту встречаемости положительной экспрессии SSTR1, SSTR2 и SSTR5.

По интенсивности окрашивания и количеству антигенпозитивных клеток в большинстве образцов контрольной группы преобладала неполная мембранная иммунореактивность. Интенсивность реакции была высокой или умеренной, а процент антигенпозитивных клеток варьировал от 15 до 50 %, что подтверждало положительный рецепторный уровень и определило возможность применения цифетрилина.

ИГХ-исследование экспрессии SSTR1–5

в опытных группах (после введения цифетрилина)

Оценка результатов ИГХ-реакции, основанная на подсчете фракции клеток с мембранной позитивностью в опытных группах на 9-й и 14-й дни после перевивки Ca-755, представлена в табл. 5 и 6 соответственно.

Как видно из табл. 5, в исследованных образцах опухолей 1-й опытной группы (после введения цифетрилина, на 9-й день после перевивки Ca-755) наиболее высокий уровень экспрессии (2+) выявлен для SSTR1 и SSTR2 (по 60 % образцов для каждого из этих типов рецепторов). При этом уровень экспрессии SSTR1 был несколько выше, чем в образцах

Таблица 4. Уровень экспрессии различных подтипов рецепторов к соматостатину (SSTRs) в опухолях контрольной группы на 9-й день после перевивки Ca-755

Table 4. Expression levels of various subtypes of somatostatin receptors (SSTRs) in tumors of the control group on day 9 after Ca-755 transplantation

Образец Sample	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
1	1+	2+	1+	1+	2+
2	0	2+	0	0	2+
3	2+	1+	1+	0	1+
4	1+	2+	1+	0	2+
5	3+	1+	1+	1+	3+

Таблица 5. Уровень экспрессии различных подтипов рецепторов к соматостатину (SSTRs) в опухоли после введения цифетрилина (на 9-й день после перевивки Ca-755)

Table 5. The level of expression of various subtypes of somatostatin receptors (SSTRs) in the tumor after the administration of cyphetrylin (on day 9 after Ca-755 transplantation)

Образец Sample	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
1	1+	2+	1+	1+	1+
2	0	1+	1+	1+	0
3	2+	2+	1+	1+	1+
4	2+	0	0	0	0
5	2+	2+	2+	0	2+

Таблица 6. Уровень экспрессии различных подтипов рецепторов к соматостатину (SSTRs) в опухоли после введения цифетрилина (на 14-й день после перевивки Ca-755)

Table 6. The level of expression of various subtypes of somatostatin receptors (SSTRs) in the tumor after the administration of cyphetrylin (on day 14 after Ca-755 transplantation)

Образец Sample	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
1	1+	3+	1+	0	3+
2	0	1+	0	1+	0
3	3+	0	0	1+	1+
4	1+	2+	0	0	0
5	0	1+	1+	0	2+

опухолей контрольной группы (40 % (2/5) образцов). Высокий уровень экспрессии SSTR5 наблюдался в 20 % (1/5) образцов, этот показатель оказался ниже, чем в группе контроля, где экспрессия SSTR5 встречалась в 80 % (4/5) образцов. Как и в контроле, в опухолевых клетках преобладала неполная мембранная иммунореактивность. Интенсивность реакции была умеренной, процент антигенпозитивных клеток варьировал от 10 до 40 %.

Согласно данным табл. 6, в 5 исследованных опухолевых образцах 2-й опытной группы (после введения цифетрилина, на 14-й день от перевивки Ca-755) высокий уровень экспрессии (2+/3+) чаще всего демонстрировали рецепторы SSTR1 (20 % образцов), SSTR2 и SSTR5 (по 40 % образцов для каждого типа рецепторов). Т. е. в сравнении с контрольной группой, где высокую частоту встречаемости SSTR1, 2 и 5 наблюдали соответственно в 40, 60 и 80 % опухолевых образцов, после введения цифетрилина отмечали изменение рецепторного статуса в сторону уменьшения частоты их встречаемости, вероятно за счет комплексирования цифетрилина с рецепторами этих типов для продолжения биологического действия.

В образцах преобладала частичная мембранная иммунореактивность, интенсивность окрашивания чаще всего была умеренной и наблюдалась в 10–30 % клеток опухоли.

Частота встречаемости различных уровней положительной экспрессии SSTR1–5 представлена на диаграммах (рис. 1–3).

В сравнении с контролем снижение частоты положительной экспрессии SSTRs наблюдалось в обеих опытных группах по SSTR2 и SSTR5 (см. рис. 1) и только во 2-й опытной группе (14-й день после перевивки) – по SSTR1 и SSTR3. Для SSTR4 отмечено увеличение частоты положительной экспрессии после введения цифетрилина в 1-й группе (9-й день после перевивки) и снижение – во 2-й группе.

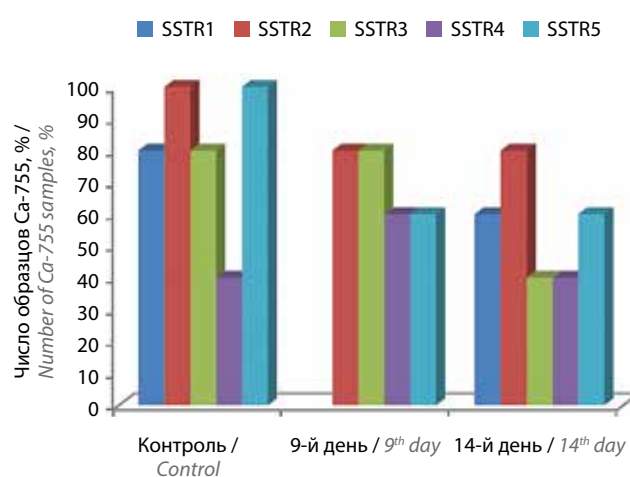


Рис. 1. Положительная экспрессия (1+/2+/3+) различных типов рецепторов к соматостатину (SSTRs) в клетках Ca-755

Fig. 1. Positive expression (1+/2+/3+) of different types of somatostatin receptors (SSTRs) in Ca-755 cells

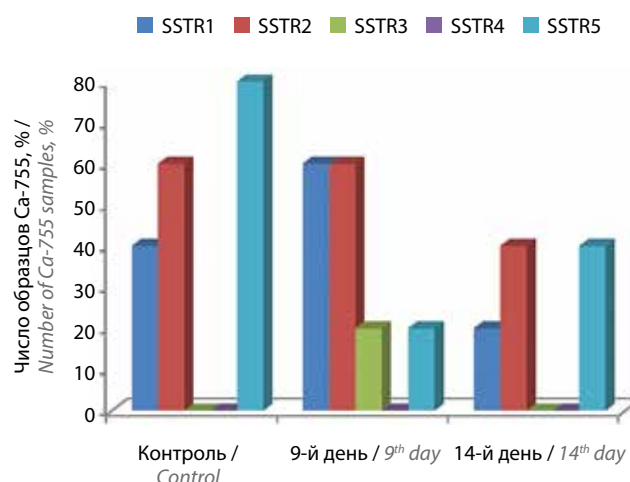


Рис. 2. Высокий уровень положительной экспрессии (2+/3+) различных типов рецепторов к соматостатину (SSTRs) в клетках Ca-755

Fig. 2. High level of positive expression (2+/3+) of different types of somatostatin receptors (SSTRs) in Ca-755 cells

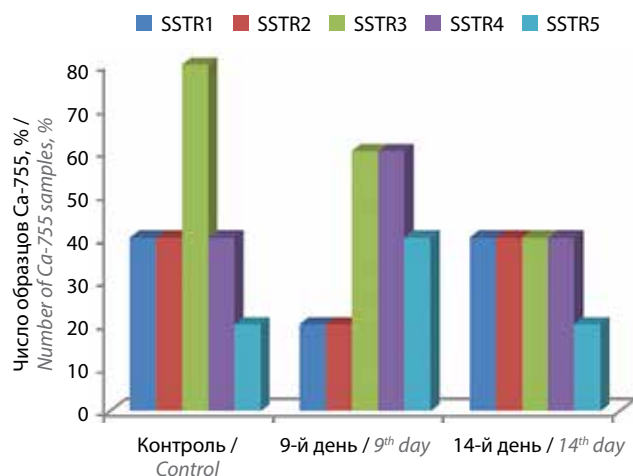


Рис. 3. Низкий уровень положительной экспрессии (1+) различных типов рецепторов к соматостатину (SSTRs) в клетках Ca-755

Fig. 3. Low level of positive expression (1+) of different types of somatostatin receptors (SSTRs) in Ca-755 cells

В исследованных образцах опухоли Ca-755 мышей в контрольной и опытных группах SSTR4 не демонстрировали высокого уровня экспрессии (см. рис. 2). Высокий уровень положительной экспрессии чаще наблюдался по SSTR1, SSTR2 и SSTR5 в контрольной группе. В опухолевых образцах 1-й опытной группы (9-й день после перевивки) отмечалось увеличение частоты встречаемости SSTR1 и SSTR3. Количество

рецепторов SSTR2, демонстрирующих высокий уровень экспрессии в контрольной и 1-й опытной группах, уменьшилось в опухолевых образцах 2-й опытной группы (14-й день после перевивки).

Низкий уровень положительной экспрессии различных типов SSTRs варьировал как в контроле, так и после введения цифетрилина: чаще наблюдался в опухолевых образцах для SSTR3 и SSTR4 в 1-й опытной группе (9-й день после перевивки) (см. рис. 3). Реже низкий уровень положительной экспрессии встречался после введения цифетрилина, в обеих опытных группах, по SSTR1, SSTR2 и SSTR5.

Положительная экспрессия SSTR1, SSTR2 и SSTR5, а также выраженность их положительной мембранной иммуореактивности в клетках Ca-755 в контрольной и опытных группах продемонстрированы на рис. 4–6.

Важно отметить, что после введения цифетрилина в образцах опухоли Ca-755 наблюдали обширные участки некроза и ослабление клеточных контактов вследствие экспрессии SSTRs (рис. 7).

Заключение

Результаты ИГХ-исследования свидетельствуют о высоком уровне экспрессии SSTR1, SSTR2 и SSTR5 в перевиваемой аденокарциноме молочной железы Ca-755 мышей. Рецепторы SSTR3 и SSTR4 не демонстрировали высокого уровня экспрессии в исследованных образцах Ca-755. Применение оригинального

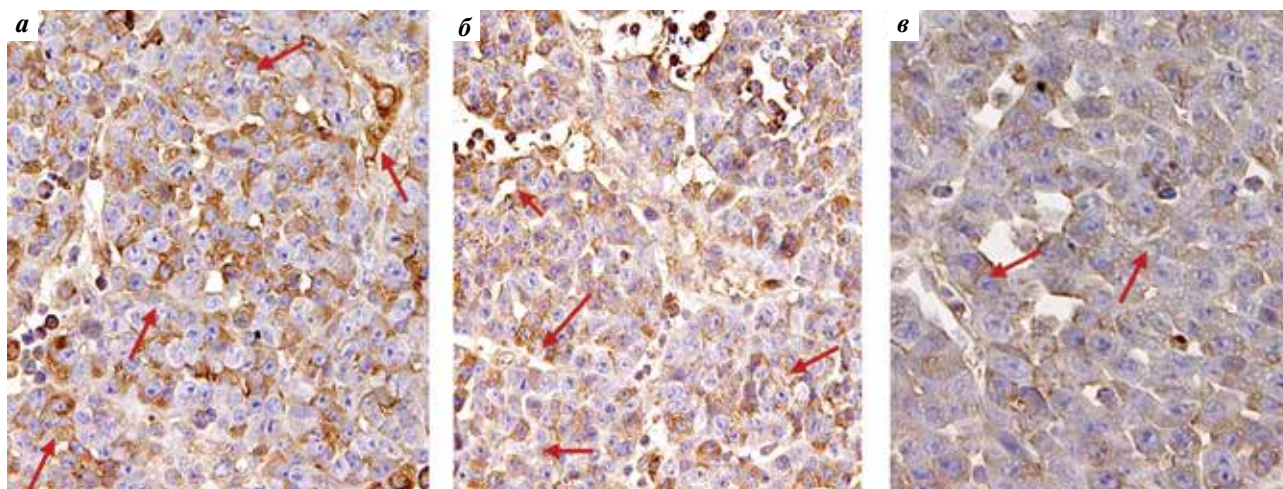


Рис. 4. Иммуногистохимическое определение экспрессии рецепторов к соматостатину 1-го типа (SSTR1) в клетках аденокарциномы молочной железы (Ca-755, генерация 3) в контроле и после введения цифетрилина: а — контрольная группа (9-й день после перевивки). Полное интенсивное окрашивание мембран 50 % клеток опухоли. Уровень экспрессии 3+ ($\times 200$); б — 1-я опытная группа (после введения цифетрилина, 9-й день после перевивки). Неполное окрашивание мембран 30 % клеток опухоли, умеренной интенсивности. Уровень экспрессии 2+ ($\times 200$); в — 2-я опытная группа (после введения цифетрилина, 14-й день после перевивки). Неполное окрашивание мембран 15 % клеток опухоли, низкой интенсивности. Уровень экспрессии 1+ ($\times 400$). Ядра клеток докрашены гематоксилином Майера

Fig. 4. Immunohistochemical determination of expression of type 1 somatostatin receptors (SSTR1) in breast adenocarcinoma cells (Ca-755, generation 3) in the control group and after cyphetrylin administration: а — the control group (9 days of transplantation). Full intensive straining of 50 % of tumor cell membranes. Expression level 3+ ($\times 200$); б — 1st experimental group (after cyphetrylin introduction, 9 days after transplantation). Incomplete membrane staining of 30 % of tumor cells, moderate intensity. Expression level 2+ ($\times 200$); в — 2nd experimental group (after cyphetrylin introduction, 14 days after transplantation). Incomplete membrane staining of 15 % of tumor cells, low intensity. Expression level 1+ ($\times 400$). Cell nuclei were stained with Mayer's hematoxylin

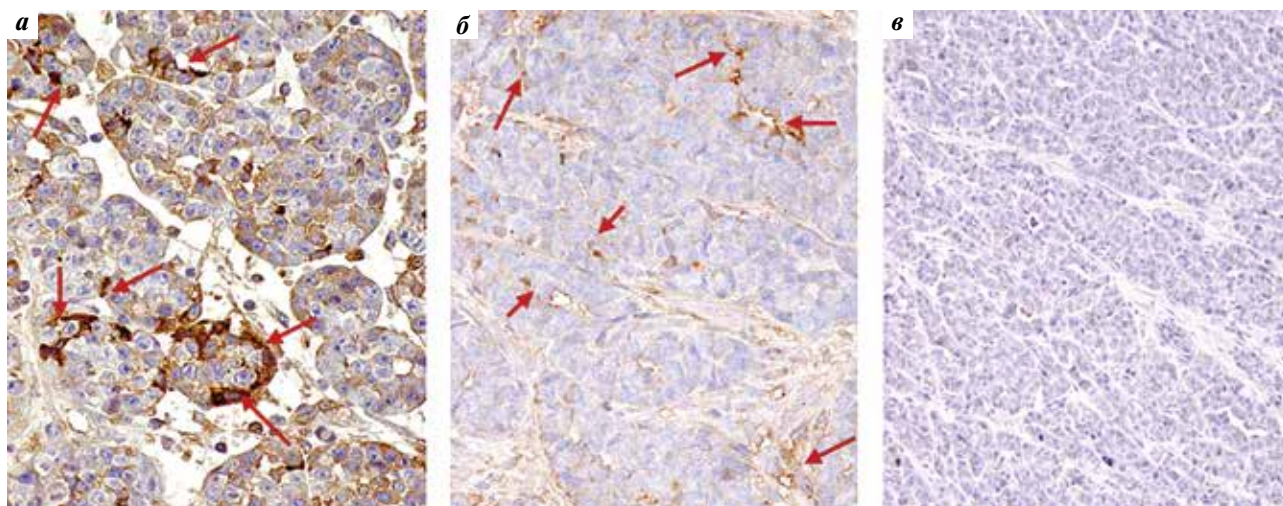


Рис. 5. Иммуногистохимическое определение экспрессии рецепторов к соматостатину 2-го типа (SSTR2) в клетках аденокарциномы молочной железы (Ca-755, генерация 3) в контроле и после введения цифетрилина: а — контрольная группа (9-й день после перевивки). Полное и частичное окрашивание мембраны 40 % клеток опухоли, высокой и умеренной интенсивности. Уровень экспрессии 3+ ($\times 200$); б — 1-я опытная группа (после введения цифетрилина, 9-й день после перевивки). Неполное слабое окрашивание мембран 10 % клеток опухоли. Уровень экспрессии 1+ ($\times 200$); в — 2-я опытная группа (после введения цифетрилина, 14-й день после перевивки). Отрицательная иммунореактивность клеток опухоли, уровень экспрессии 0 ($\times 100$). Ядра клеток докрашены гематоксилином Майера

Fig. 5. Immunohistochemical determination of expression of somatostatin type 2 receptors (SSTR2) in breast adenocarcinoma cells (Ca-755, generation 3) in the control group and after cyphetrylin administration: a — the control group (9 days after transplantation). Full and partial membrane staining of 40 % of tumor cells, high and moderate intensity. Expression level 3+ ($\times 200$); б — 1st experimental group (after cyphetrylin introduction, 9 days after transplantation). Incomplete weak membrane staining of 10 % of tumor cells. Expression level 1+ ($\times 200$); в — 2nd experimental group (after cyphetrylin introduction, 14 days after transplantation). Negative immunoreactivity of tumor cells, expression level 0 ($\times 100$). Cell nuclei were stained with Mayer's hematoxylin

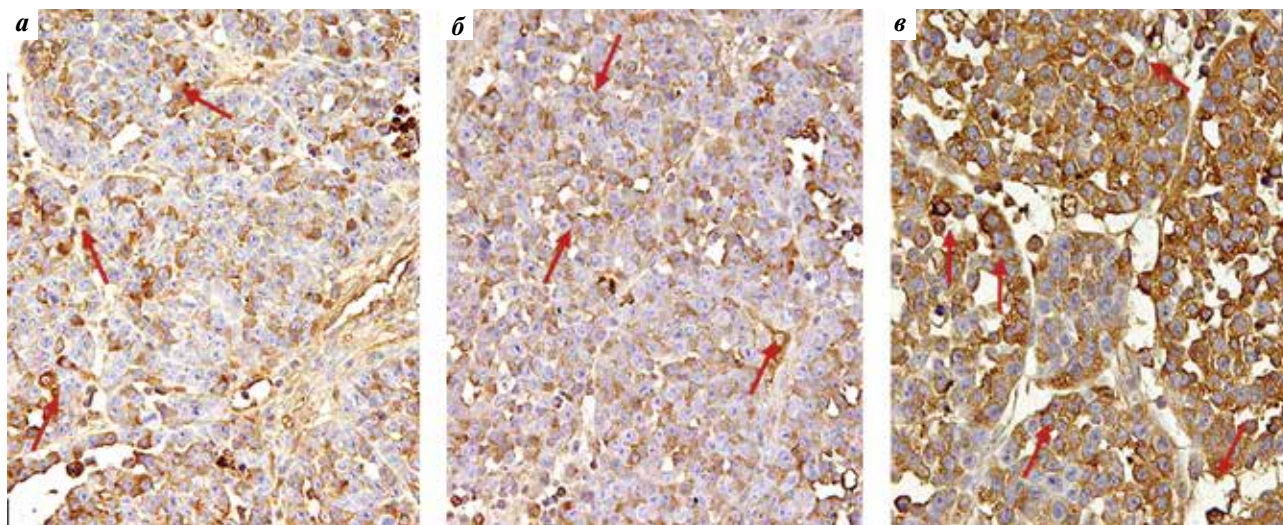


Рис. 6. Иммуногистохимическое определение экспрессии рецепторов к соматостатину 5-го типа (SSTR5) в клетках аденокарциномы молочной железы (Ca-755, генерация 3) в контроле и после введения цифетрилина: а — контрольная группа (9-й день после перевивки). Частичное окрашивание мембран 25 % клеток опухоли, умеренной интенсивности. Уровень экспрессии 2+ ($\times 200$); б — 1-я опытная группа (после введения цифетрилина, 9-й день после перевивки). Неполное окрашивание мембран 30 % клеток опухоли, умеренной интенсивности. Уровень экспрессии 2+ ($\times 200$); в — 2-я опытная группа (после введения цифетрилина, 14-й день после перевивки). Полное окрашивание мембран 30 % клеток опухоли, высокой интенсивности. Уровень экспрессии 3+ ($\times 200$). Ядра клеток докрашены гематоксилином Майера

Fig. 6. Immunohistochemical determination of expression of somatostatin type 5 receptors (SSTR5) in breast adenocarcinoma cells (Ca-755, generation 3) in the control group and after cyphetrylin administration: a — the control group (9 days after transplantation). Partial staining of 25 % of tumor cells membranes, moderate intensity. Expression level 2+ ($\times 200$); б — 1st experimental group (after the cyphetrylin introduction, 9 days after transplantation). Incomplete membrane staining of 30 % of tumor cells, moderate intensity. Expression level 2+ ($\times 200$); в — 2nd experimental group (after the cyphetrylin introduction, 14 days after transplantation). Full membrane staining of 30 % of tumor cells, high intensity. Expression level 3+ ($\times 200$). Cell nuclei were stained with Mayer's hematoxylin

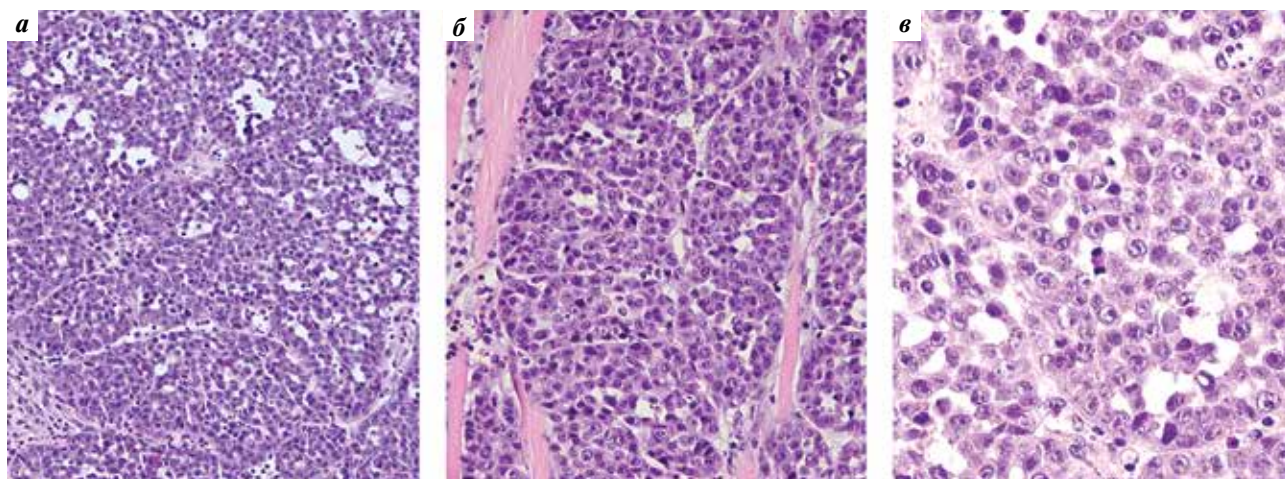


Рис. 7. Гистологическое строение аденокарциномы молочной железы Ca-755 (генерация 3) в контроле и после введения цифетрилина: а – контрольная группа (9-й день после перевивки). Клетки опухоли формируют солидные структуры, имеют округлую форму, гиперхромные ядра и эозинофильную цитоплазму ($\times 100$); б – 1-я опытная группа (после введения цифетрилина, 9-й день после перевивки). Комплексы опухолевых клеток разделены прослойками фиброзной стромы ($\times 200$); в – 2-я опытная группа (после введения цифетрилина, 14-й день после перевивки). Опухоль состоит из рыхло расположенных клеток, теряющих межклеточные связи ($\times 400$). Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 7. Histological structure of breast adenocarcinoma Ca-755 (generation 3) in the control group and after cyphetrylin administration: а – the control group (9 days after transplantation). Tumor cells form solid structures, have a rounded shape, hyperchromic nuclei and eosinophilic cytoplasm ($\times 100$); б – 1st experimental group (after the cyphetrylin introduction, 9 days after transplantation). Tumor cell complexes are separated by layers of fibrous stroma ($\times 200$); в – 2nd experimental group (after cyphetrylin introduction, 14 days after transplantation). The tumor consists of loosely located cells that lose intercellular connections ($\times 400$). Hematoxylin and eosin staining

аналога соматостатина цифетрилина показало изменение рецепторного статуса в сторону уменьшения количества рецепторов SSTR1, SSTR2, SSTR5 и сохранение статуса в контроле. При ИГХ-окрашивании Ca-755 антителами к SSTRs отмечено снижение процента антигенпозитивных клеток с 15–50 % в контрольной группе до 10–40 % и 10–30 % после введения цифетрилина (на 9-й и 14-й дни

после перевивки Ca-755 соответственно). При гистологическом исследовании наблюдали обширные участки некроза и ослабление клеточных контактов. При изучении действия цифетрилина на экспрессию SSTRs в опухолевых образцах Ca-755 мышей доказано сродство цифетрилина к SSTRs, за счет связывания с которыми реализуется его прямое противоопухолевое действие.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Barbieri F., Bajetto A., Pattarozzi A. et al. Peptide receptor targeting in cancer: the somatostatin paradigm. *Int J Pept* 2013;2013:926295. DOI: 10.1155/2013/926295
- Kumar U., Grant M. Somatostatin and somatostatin receptors. In: *Cellular peptide hormone synthesis and secretory pathways*. Ed. by J.F. Rehfeld, J.R. Bundgaard. Berlin: Springer, 2010. Pp.: 97–120. DOI: 10.1007/400_2009_29
- Günther T., Tulipano G., Dournaud P. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin receptors: structure, function, ligands, and new nomenclature. *Pharmacol Rev* 2018;70(4):763–835. DOI: 10.1124/pr.117.015388
- Klomp M.J., Dalm S.U., de Jong M. et al. Epigenetic regulation of somatostatin and somatostatin receptors in neuroendocrine tumors and other types of cancer. *Rev Endocr Metab Disord* 2021;22(3):495–510. DOI: 10.1007/s11154-020-09607-z
- Bartsch D.K., Scherübl H. Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Visc Med* 2017;33(5):321–2. DOI: 10.1159/000481766
- Klöppel G. Neuroendocrine neoplasms: dichotomy, origin and classifications. *Visc Med* 2017;33(5):324–30. DOI: 10.1159/000481390
- Mafficini A., Scarpa A. Genetics and epigenetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Rev* 2019;40(2):506–36. DOI: 10.1210/er.2018-00160
- Vinik A.I., Chaya C. Clinical presentation and diagnosis of neuroendocrine tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 2016;30(1):21–48. DOI: 10.1016/j.hoc.2015.08.006
- Cakir M., Dworakowska D., Grossman A. Somatostatin receptor biology in neuroendocrine and pituitary tumours: part 1 – molecular pathways. *J Cell Mol Med* 2010;14(11):2570–84. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01125.x
- Watanabe H., Fujishima F., Komoto I. et al. Somatostatin receptor 2 expression profiles and their correlation with the efficacy of somatostatin analogues in gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Cancers (Basel)* 2022;14(3):775. DOI: 10.3390/cancers14030775

11. Hankus J., Tomaszewska R. Neuroendocrine neoplasms and somatostatin receptor subtypes expression. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 2016;19(2):111–7. DOI: 10.5603/NMR.2016.0022
12. Hofland J., Kaltsas G., de Herder W.W. Advances in the diagnosis and management of well-differentiated neuroendocrine neoplasms. *Endocr Rev* 2020;41(2):371–403. DOI: 10.1210/edrv/bnz004
13. Hu Y., Ye Z., Wang F. et al. Role of somatostatin receptor in pancreatic neuroendocrine tumor development, diagnosis and therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12:679000. DOI: 10.3389/fendo.2021.679000
14. Hallet J., Law C.H.L., Cukier M. et al. Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: a population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes. *Cancer* 2015;121(4):589–97. DOI: 10.1002/cncr.29099
15. Vesterinen T., Leijon H., Mustonen H. et al. Somatostatin receptor expression is associated with metastasis and patient outcome in pulmonary carcinoid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104(6):2083–93. DOI: 10.1210/jc.2018-01931
16. Моргунов Л.Ю. Аналоги соматостатина в лечении нейроэндокринных опухолей. *ПМЖ* 2019;27(6):10–14. Доступно по: https://www.rmj.ru/articles/onkologiya/Analogi_somatostatina_v_lechenii_neyroendokrinyh_opuholey/#ixzz75J4HQaUz. Morgunov L.Yu. Somatostatin analogs in neuroendocrine tumors treatment. *RMJ = RMJ* 2019;27(6):10–14. Available at: https://www.rmj.ru/articles/onkologiya/Analogi_somatostatina_v_lechenii_neyroendokrinyh_opuholey/#ixzz75J4HQaUz. (In Russ.).
17. Pryma A., Matinkhoo K., Jia Bu Y. et al. Synthesis and preliminary evaluation of octreotate conjugates of bioactive synthetic amatoxins for targeting somatostatin receptor (sstr2) expressing cells. *RSC Chem Biol* 2022;3(1):69–78. DOI: 10.1039/d1cb00036e
18. Wang Y., Wang W., Jin K. et al. Somatostatin receptor expression indicates improved prognosis in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm, and octreotide long-acting release is effective and safe in Chinese patients with advanced gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Oncol Lett* 2017;13(3):1165–74. DOI: 10.3892/ol.2017.5591
19. Labadzhyan A., Nachtigall L.B., Fleseriu M. et al. Oral octreotide capsules for the treatment of acromegaly: comparison of 2 phase 3 trial results. *Pituitary* 2021;24(6):943–53. DOI: 10.1007/s11102-021-01163-2
20. Gulde S., Wiedemann T., Schillmaier M. et al. Gender-specific efficacy revealed by head-to-head comparison of pasireotide and octreotide in a representative *in vivo* model of nonfunctioning pituitary tumors. *Cancers (Basel)* 2021;13(12):3097. DOI: 10.3390/cancers13123097
21. Pedroncelli A.M. Medical treatment of Cushing's disease: somatostatin analogues and pasireotide. *Neuroendocrinology* 2010;92(Suppl 1):120–4. DOI: 10.1159/000314352
22. Streit L., Moog S., Hugel S. et al. Somatostatin analogue pasireotide (SOM230) inhibits catecholamine secretion in human pheochromocytoma cells. *Cancer Lett* 2022;524:232–44. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.10.009
23. Schmid H.A. Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications. *Mol Cell Endocrinol* 2008;286(1–2):69–74. DOI: 10.1016/j.mce.2007.09.006
24. Gut P., Czarnywojtek A., Sawicka-Gutaj N. et al. Evaluation of the expression of somatostatin receptors by immunohistochemistry in neuroendocrine tumors of the small intestine. *Pol J Pathol* 2020;71(1):30–7. DOI: 10.5114/pjp.2020.95413
25. Popa O., Taban S.M., Pantea S. et al. The new WHO classification of gastrointestinal neuroendocrine tumors and immunohistochemical expression of somatostatin receptor 2 and 5. *Exp Ther Med* 2021;22(4):1179. DOI: 10.3892/etm.2021.10613
26. Коломеецева А.А., Делекторская В.В., Орел Н.Ф. и др. Рецепторы соматостатина как потенциальная терапевтическая мишень в лечении распространенного аденокортикального рака. Клинический случай. *Сибирский онкологический журнал* 2018;17(2):111–7. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-2-111-117
27. Гуревич Л.Е., Корсакова Н.А., Воронкова И.А. и др. Иммуногистохимическое определение экспрессии рецепторов к соматостатину 1, 2A, 3 и 5-го типов в нейроэндокринных опухолях различной локализации и степени злокачественности. *Альманах клинической медицины* 2016;44(4):378–90. DOI: 10.18786/2072-0505-2016-44-4-378-390
28. Gurevich L.E., Korsakova N.A., Voronkova I.A. et al. Immunohistochemical determination of expression of somatostatin receptors types 1, 2A, 3 and 5 in neuroendocrine tumors of various localization and grade. *Almanah klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine* 2016;44(4):378–90. (In Russ.). DOI: 10.18786/2072-0505-2016-44-4-378-390
29. Franck S.E., Gatto F., van der Lely A.J. et al. Somatostatin receptor expression in GH-secreting pituitary adenomas treated with long-acting somatostatin analogues in combination with pegvisomant. *Neuroendocrinology* 2017;105(1):44–53. DOI: 10.1159/000448429
30. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Федоров В.Е. и др. Синтез и изучение цитотоксической активности аналогов гипоталамического гормона соматостатина. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(4):47–53. Balaev A.N., Osipov V.N., Fedorov V.E. et al. Synthesis and cytotoxic activity for hypothalamic hormone somatostatin analogs. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2012;11(4):47–53. (In Russ.).
31. Борисова Л.М., Киселева М.П., Осипов В.Н. и др. Цитотоксические аналоги цифетрилина (сообщение II). *Российский биотерапевтический журнал* 2017;2(16):23–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-23-29
32. Borisova L.M., Kiseleva M.P., Osipov V.N. et al. Cyphetrylin cytotoxic analogues (report II). *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;2(16):23–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-23-29
33. Шпрах З.С., Ярцева И.В., Игнатьева Е.В. и др. Синтез и химико-фармацевтические характеристики аналога соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью. *Химико-фармацевтический журнал* 2014;48(3):19–22. DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-3-19-22
34. Shprakh Z.S., Yartseva I.V., Ignat'eva E.V. et al. Synthesis and chemico-pharmaceutical characterization of somatostatin analog with antitumor activity. *Himiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal* 2014;48(3):19–22. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-3-19-22
35. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина, А. Голдина, И. Кляйн. М.: Медицина, 1980. 296 с. Experimental evaluation of antitumor drugs in the USSR and the USA. Ed. by Z.P. Sofina, A.B. Syrkin, A. Goldin, A. Klein. Moscow: Meditsina, 1980. 296 p. (In Russ.).
36. Volante M., Brizzi M.P., Faggiano A. et al. Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod Pathol* 2007;20(11):1172–82. DOI: 10.1038/modpathol.3800954

Вклад авторов

М.П. Киселева: проведение эксперимента *in vivo*, написание текста рукописи, анализ результатов исследования;
Л.М. Борисова: проведение эксперимента *in vivo*, анализ результатов исследования, редактирование текста рукописи;
В.В. Делекторская: проведение иммуногистохимического исследования, работа с иллюстрационным материалом рукописи, обработка результатов исследования, обсуждение результатов;
З.С. Шпрах: редактирование текста рукописи;
С.В. Устинкина: синтез, очистка и характеристика субстанции цифетрилина;
И.Ю. Кубасова: разработка дизайна эксперимента.

Authors contributions

M.P. Kiseleva: conducting an *in vivo* experiment, analyzing the results of the study, writing the text of the manuscript;
L.M. Borisova: conducting an *in vivo* experiment, processing and analysis of research results, editing the text of the manuscript;
V.V. Delektorskaya: conducting an immunohistochemical study, working with the illustrative material of the manuscript, processing the results of the study, discussing the results;
Z.S. Shprakh: editing the text of the manuscript;
S.V. Ustinkina: synthesis, purification and characterization of the cyphetrylin substance;
I.Yu. Kubasova: development of the design of the experiment.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.П. Киселева / M.P. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-4309-6722>
Л.М. Борисова / L.M. Borisova: <https://orcid.org/0000-0003-4613-4584>
В.В. Делекторская / V.V. Delektorskaya: <https://orcid.org/0000-0002-4550-2069>
З.С. Шпрах / Z.S. Shprakh: <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>
С.В. Устинкина / S.V. Ustinkina: <https://orcid.org/0000-0002-0298-3894>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено в рамках государственного задания по теме «Фармацевтическая разработка и доклинические исследования оригинальных инновационных лекарственных средств с улучшенным профилем безопасности для лечения злокачественных новообразований» (№ АААА-А20-120031190013-9, 2020–2022 гг.).

Funding. The study was performed in the framework research work “Pharmaceutical development and preclinical studies of original innovative drugs with an improved safety profile for the treatment of malignant neoplasms” (№ АААА-А20-120031190013-9, 2020–2022).

Статья поступила: 09.08.2022. Принята к публикации: 19.09.2022.

Article submitted: 09.08.2022. Accepted for publication: 19.09.2022.