

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-41-47>

# Доклинические характеристики дуплексов миРНК в качестве таргетных адъювантов при злокачественном росте

Е.М. Трещалина<sup>1</sup>, Г.Б. Смирнова<sup>1</sup>, А.Ю. Кузеванова<sup>2</sup>, С.Ш. Каршиева<sup>1</sup>, М.В. Киселевский<sup>1</sup>,  
А.В. Карпукхин<sup>2</sup>, М.А. Маслов<sup>3</sup>, А.А. Алимов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»; Россия, 119454 Москва, пр-кт Вернадского, 78

**Контакты:** Елена Михайловна Трещалина [treshalina@yandex.ru](mailto:treshalina@yandex.ru)

**Введение.** Известно, что малые, или короткие, двухцепочечные интерферирующие РНК – миРНК (small interfering RNA, siRNA) длиной 20–25 нуклеотидов – способны адресно блокировать неконтролируемую злокачественную пролиферацию клеток. В качестве генов-мишеней рассматриваются ингибиторы апоптоза, в том числе клеточный гликопротеин CD47 (cluster of differentiation 47), и гены репликативного комплекса, регулирующие клеточный цикл в S-фазе. Это обуславливает актуальность исследования на опухолевых моделях, направленных на эти мишени миРНК в качестве адъювантов.

**Цель исследования** – оценка антипролиферативного действия на моделях колоректального рака и рака почки человека новых миРНК как адъювантов для иммуно-/химиотерапии.

**Материалы и методы.** МиРНК/антиCD47 и двухкомпонентная миРНК антиMCM4/антиLIVIN разработаны в Медико-генетическом научном центре им. акад. Н.П. Бочкова и изучены в виде липидной дисперсии для внутривенного введения. Доклинические модели – подкожные ксенографты рака толстой кишки РТК-8 и рака почки человека Рпоч1/CD47, мыши Balb/c nude – получены из НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. В адъювантном режиме миРНК/антиCD47 изучена в сочетании с активированными макрофагами человека (AM), миРНК антиMCM4/антиLIVIN (1:1) – с циклозависимым цитостатиком оксалиплатином (ОХР). Режимы введения обоснованы ранее. Показатели и критерии эффективности (treatment/control (T/C) ≤42 %), переносимость воздействий и статистический анализ при  $p < 0,05$  – стандартные для экспериментальной терапии рака. Лабораторные манипуляции регламентированы действующими рекомендациями Минздрава России.

**Результаты.** Схема миРНК/антиCD47 + AM практически неэффективна на Рпоч-1/CD47, T/C = 45 % ( $p > 0,05$ ). Схема с миРНК антиMCM4/антиLIVIN + 24 ч на РТК-8, малочувствительном к ОХР, показала значимый адъювантный эффект в сравнении с монокимиотерапией, T/C = 33–21 % против T/C<sub>min</sub> = 49 % ( $p \leq 0,05$ ). Обе схемы хорошо переносимы.

**Заключение.** Доклиническое изучение показало спорность предположения о возможности адъювантного применения миРНК/антиCD47 с AM и перспективность миРНК антиMCM4/антиLIVIN на малочувствительной к циклозависимому ОХР модели рака толстой кишки человека с возможностью синхронизации клеточного цикла.

**Ключевые слова:** миРНК, онкомишень, опухолевая модель, антипролиферативное действие, адъювантный режим

**Для цитирования:** Трещалина Е.М., Смирнова Г.Б., Кузеванова А.Ю. и др. Доклинические характеристики дуплексов миРНК в качестве таргетных адъювантов при злокачественном росте. Российский биотерапевтический журнал 2025;24(2):41–7.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-41-47>

## Preclinical characteristics of siRNA duplexes as targeted adjuvants in malignant growth

Helen M. Treshalina<sup>1</sup>, Galina B. Smirnova<sup>1</sup>, Anna Yu. Kuzevanova<sup>2</sup>, Saida Sh. Karshieva<sup>1</sup>, Mikhail V. Kiselevskiy<sup>1</sup>,  
Alexander V. Karpukhin<sup>2</sup>, Mikhail A. Maslov<sup>3</sup>, Andrei A. Alimov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

<sup>2</sup>Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia;

<sup>3</sup>MIREA–Russian Technological University; 78 Vernadsky Prospekt, Moscow 119454, Russia

**Contacts:** Helen Mikhailovna Treshalina [treshalina@yandex.ru](mailto:treshalina@yandex.ru)

**Background.** Small or short double-stranded interfering RNAs (siRNAs, small interfering RNAs) 20–25 nucleotides long are known to be able to target block uncontrolled malignant proliferation. As target genes, apoptosis inhibitors are considered, including the cellular glycoprotein CD47 (cluster of differentiation 47), and genes of the replicative complex that regulate the cell cycle in the S phase. This determines the relevance of the study in tumor models of siRNAs aimed at these targets as adjuvants.

**Aim.** To evaluate the antiproliferative effects of novel siRNAs as adjuvants for immune-/chemotherapy in human colorectal and renal cancer models.

**Materials and methods.** siRNA/antiCD47 and two-component siRNA antiMSM4/antiLIVIN were developed at the Research Centre for Medical Genetics and studied in lipid dispersion for intravenous (IV) administration. Preclinical models – subcutaneous xenographs of RTK-8 colon cancer and human kidney cancer Rpoch-1/CD47, Balb/c nude mice were obtained from the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. In the adjuvant mode, siRNA/antiCD47 was studied in combination with activated human macrophages (AM), siRNA antiMSM4/antiLIVIN (1:1) – with cyclic-dependent cytostatic oxaliplatin (OXP). Administration regimens are justified earlier. Efficacy parameters and criteria (treatment/control (T/C)  $\leq 42\%$ ), tolerability of effects and statistical analysis at  $p < 0.05$  are standard for experimental cancer therapy. Laboratory manipulations are regulated by the current recommendations of the Ministry of Health of the Russia.

**Results.** The siRNA/anti-CD47 + AM regimen was practically ineffective at Rpoch-1/CD47, T/C = 45 % ( $p > 0.05$ ). The antiMCM4/antiLIVIN + 24 h siRNA regimen on an OXP-insensitive RTK-8 showed a significant adjuvant effect against cytostatic, T/C = 33–21 % versus T/C<sub>min</sub> = 49 % ( $p \leq 0.05$ ). Both combinations were tolerable.

**Conclusion.** Preclinical study showed the controversy of the assumption about the possibility of adjuvant use of siRNA/antiCD47 with AM and the promise of antiMSM4/antiLIVIN siRNA on low-sensitivity to cycle-dependent OXR in human colon cancer with the possibility of cell cycle synchronization.

**Keywords:** siRNAs, cancer marker, tumor model, antiproliferative action, adjuvant scheme

**For citation:** Treshalina H.M., Smirnova G.B., Kuzevanova A.Yu. et al. Preclinical characteristics of siRNA duplexes as targeted adjuvants in malignant growth. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2025;24(2):41–7. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2025-24-2-41-47>

## Введение

Исследования по созданию лекарственных препаратов на основе малых интерферирующих РНК (миРНК) ведутся с момента открытия механизма РНК-интерференции (RNAi) в 1998 г. Механизм задействован в активации процесса деградации микроРНК (мРНК) в клетках эукариотов и является важным элементом посттранскрипционной регуляции экспрессии генов [1]. В связи с этим выделяют 2 группы молекул, представляющих интерес с точки зрения таргетной терапии: мРНК и миРНК. В 1-ю группу включают независимо транскрибируемые единицы генома, гены которых расположены в определенных хромосомных локусах. Ко 2-й группе относят молекулы, которые образуются в результате биогенеза мРНК или поступают в клетки извне в результате эндоцитоза [2]. Вне зависимости от процесса обработки все миРНК до связывания с РНК-индуцируемым комплексом выключения генов (RNA-induced silencing complex, RICS) представляют собой дуплексы, образованные 2 короткими комплементарными молекулами РНК длиной 20–25 нуклеотидов. Показано, что миРНК, направленно ингибирующие экспрессию генов, регулирующих пролиферацию, могут рассматриваться в качестве потенциальных таргетных адьювантов для поддержания или усиления противоопухолевого действия при раке толстой кишки [3]. В качестве возможных таргетных препаратов также рассматриваются миРНК, способные подавить экспрессию генов-ингибиторов апоптоза при различных локализациях рака [4, 5]. Показано, что совместное ингибирование экспрессии генов *TGF-β1* и *COX-2* при помощи миРНК способствует подавлению роста клеток гепатоцеллюлярной карциномы, инфильтрации Т-клеток в опухоль и улучшению ответа на ингибиторы иммунных контрольных точек на мышиных моделях [6]. Для усиления фагоцитарной активности инфильтрованных в ткань опухоли фагоцитов предлагается блокировать при помощи миРНК экспрессию гена *CD47* в клетках опухоли, белковый продукт которого – клеточный гликопротеин CD (cluster of differentiation) 47, связываясь с рецептором сигнально-регуляторного белка  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ), подавляет фагоцитоз опухолевой клетки [7]. Подобные эффекты некоторых

зано, что миРНК, направленно ингибирующие экспрессию генов, регулирующих пролиферацию, могут рассматриваться в качестве потенциальных таргетных адьювантов для поддержания или усиления противоопухолевого действия при раке толстой кишки [3]. В качестве возможных таргетных препаратов также рассматриваются миРНК, способные подавить экспрессию генов-ингибиторов апоптоза при различных локализациях рака [4, 5]. Показано, что совместное ингибирование экспрессии генов *TGF-β1* и *COX-2* при помощи миРНК способствует подавлению роста клеток гепатоцеллюлярной карциномы, инфильтрации Т-клеток в опухоль и улучшению ответа на ингибиторы иммунных контрольных точек на мышиных моделях [6]. Для усиления фагоцитарной активности инфильтрованных в ткань опухоли фагоцитов предлагается блокировать при помощи миРНК экспрессию гена *CD47* в клетках опухоли, белковый продукт которого – клеточный гликопротеин CD (cluster of differentiation) 47, связываясь с рецептором сигнально-регуляторного белка  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ), подавляет фагоцитоз опухолевой клетки [7]. Подобные эффекты некоторых

миРНК описаны не только на клетках и модельных системах, но и при системном (внутривенном или подкожном) введении в клинику при терапии редких наследственных заболеваний — амилоидной полинейропатии и острой печеночной порфирии [2]. Среди отечественных соединений такого типа интересны полученные в лаборатории молекулярной генетики Медико-генетического научного центра комплексы, созданные на основе двухцепочечных миРНК длиной 21 нуклеотид. Новые агенты представляют собой липидную дисперсию РНК (рабочие шифры миРНК/антиCD47, миРНК антиMCM4/антиLIVIN) и вызывают интерес в онкологии в качестве адресных корректоров злокачественной цитопротиперации, например, при раке толстой кишки и раке почки. В статье приведен экспериментальный подход к изучению новых миРНК на моделях опухолей человека *in vivo* под контролем переносимости.

**Цель исследования** — оценка антипролиферативного действия на моделях колоректального рака и рака почки человека новых миРНК как адъювантов для иммуно-/химиотерапии.

## Материалы и методы

### Верификация клеточных мишеней для тестируемых миРНК

Использованы перевиваемые клеточные линии опухолей человека из биобанка НИИ онкологии им. Н.Н. Блохина: светлоклеточный рак почки Рпоч1КК для миРНК/антиCD47 и колоректальный полипозный рак НТ-29 для миРНК антиMCM4/антиLIVIN. Обе линии культивировали в стандартных условиях. Эффективность РНК-интерференции оценивали по изменению относительного числа копий РНК в клетке методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве контролей использовали клетки без обработки, в случае миРНК/антиCD47 также обработанные липосомальным вектором, загруженным случайными (non-targeting) миРНК CON1 [8]. Суммарную фракцию РНК из клеток выделяли общепринятым способом с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия). Относительное определение уровня представленности транскрипта в образце проводили с использованием стандартного оборудования и программного обеспечения Applied Biosystems QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США), для внутреннего контроля — ген *GAPDH*. Последовательности праймеров представлены в табл. 1.

### Объекты

Оба агента (далее — сочетания) — это липофильные субстанции на основе таргетных миРНК миРНК/антиCD47 и двухкомпонентной миРНК антиMCM4/антиLIVIN. Субстанции получали в лаборатории

Таблица 1. Последовательности праймеров генов-мишеней

Table 1. Primer sequences of target genes

миРНК siRNA	Ген Gen	Праймер Primer
АнтиCD47 AntiCD47	<i>CD47-F</i>	5'-AGAAGGTGAAA CGATCATCGAGC-3'
	<i>CD47-R</i>	5'-СТСАТССАТА ССАСССГГАТСТ-3'
АнтиMCM4 AntiMCM4	<i>MCM4-F</i>	5'-GACAAGATGA ATGAAAGTACAA-3'
	<i>MCM4-R</i>	5'-GTCCAGCAAG AGGAAGATCAA-3'
АнтиLIVIN AntiLIVIN	<i>LIVIN-F</i>	5'-AGACTCACT CCCAGCTGC-3'
	<i>LIVIN-R</i>	5'-TTGCACGTC CTCTCCTCC-3'
Контроль Control	<i>GAPDH-F</i>	5'-GGCTGCTTT TAACTCTGG-3'
	<i>GAPDH-R</i>	5'-GGAGGGAT CTCGCTCC-3'

молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний МГНЦ им. акад. Н.П. Бочкова с использованием дисперсии катионных липосом. Субстанции представляли собой готовые стерильные растворы для инъекций с pH 6,8–7,4. Для введения мышам ранее установлена переносимость растворов под контролем отсутствия гибели от тромбоэмболии из-за возможной агрегации частиц. Инъекции выполняли в хвостовую вену мыши в индивидуальном режиме, все растворы вводили *ex tempore*.

МиРНК/антиCD47 содержит липидную дисперсию и двухцепочечные молекулы РНК длиной 21 нуклеотид, которые образуют наноструктурированные липоплексы (частицы) диаметром  $120 \pm 20$  нм [9]. Достаточная для подавления экспрессии таргетного гена в линии клеток Рпоч1 КК/CD47 концентрация миРНК/антиCD47, определенная предварительно через 48 ч после трансфекции, составляла от 25 до 50 нМ. Учитывая короткий период действия блокатора для применения АМ, рекомендован интервал 24 ч после курса миРНК.

Для внутривенного введения использован раствор 0,025 % концентрации (0,25 мг/мл по активному началу), разовая доза 3 мг/кг (75 мкг/мышь) в объеме 0,3 мл, необходимые сведения для анализа результатов. АМ получены из периферической крови здоровых доноров и активированы липополисахаридом (методика описана в разделе «Результаты»). Исходная концентрация готовой инъекционной суспензии АМ

в изотоническом растворе составляла  $2 \times 10^7$  кл/мл, рабочая концентрация —  $1 \times 10^6$  кл/мышь.

Сочетание миРНК/антиCD47 + 6 ч + АМ внутривенно вводили непосредственно после приготовления раствора мышам с подкожными ксенографтами рака почки Рпоч1/CD47 с помощью стерильных одноразовых пластиковых шприцов. Введение сочетания повторяли 3-кратно с интервалом 6 ч, разовая доза миРНК/антиCD47 составила 3 мг/кг в 0,3 мл, разовая доза АМ —  $1 \times 10^5$  кл/мышь в 0,1 мл. График введения: 4, 6 и 8-е сутки после имплантации опухоли.

АнтиMCM4/антиLIVIN — субстанция в виде суспензии в инъекционном растворе, концентрация 0,25 мг/мл (растворитель — стерильный физиологический раствор), содержание основного вещества в антиMCM4/антиLIVIN составляло 99 %. Введение мышам с РТК-8 выполняли внутривенно медленно (в течение 1 мин) в разовой дозе 5 мг/кг в режиме 3-кратного курса с интервалом 48 ч (суммарно 15 мг/кг). Сроки лечения — 5, 7 и 9-е сутки по отношению к имплантации опухоли.

Оксалиплатин (ОХР) — коммерческий препарат (Sanofi-Aventis France, Франция) во флаконе 20 мл (концентрация 5 мг/мл). В монорежиме ОХР вводили мышам с РТК-8 внутривенно однократно в эффективной дозе 12,5 мг/кг [10] после окончания введения миРНК (10-е сут опыта).

Сочетание антиMCM4/антиLIVIN + 24 ч + ОХР вводили последовательно в указанной схеме.

**Лабораторные животные.** Иммунодефицитные мыши (разведения и содержания НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [11]) отобраны под контролем стандартной динамики прироста массы тела путем взвешивания в день начала опыта на электронных весах MW-T series, User's Manual (CAS, США) с ценой деления 0,01 г. Отобранных мышей массой тела 20–22 г делили на группы по 6–8 особей, одну из групп без специфического лечения (мыши получали внутривенно физиологический раствор в соответствующем объеме и схеме введения) использовали для контроля роста опухоли (КРО).

**Опухолевые модели.** Подкожные ксенографты рака почки человека Рпоч1 (клеточная линия Рпоч1 КК) и рака толстой кишки человека РТК-8 (клеточная линия НТ29) получены из Коллекции опухолевых штаммов человека НМИЦ [12]. Первая подкожная имплантация опухоли после криохранения выполнена 2 мышам-донорам по  $5 \times 10^6$  клеток в объеме 0,5 мл на мышь. Для опыта использованы донорские опухоли 2-го пассажа *in vivo*, достигшие пальпируемых размеров; 20 % опухолевую суспензию трансплантировали билатерально (в правый и левый бок) по 50 мг на мышь, соответственно в каждой группе по 12–16 опухолевых узлов. Особенности схем лечения даны при описании каждого из агентов. На-

личие экспрессии CD47 в клетках Рпоч1 КК подтверждено заранее.

**Оценка эффективности воздействия.** После окончания лечения у мышей всех групп трехкратно измеряли объемы опухолей и рассчитывали соотношение средних объемов опухолей Т/С (treatment/control) как стандартный показатель эффективности. Критерий эффективности — Т/С < 42 %, при Т/С = 100 % в группе КРО. В ряде случаев внутри каждой группы дополнительно оценивали в динамике скорость роста опухоли как соотношение средних объемов опухолевых узлов в последующий срок наблюдения по отношению к предыдущему  $[V_x/V_{x-1}]$  [13].

**Оценка переносимости воздействия.** В период проведения эксперимента контролировали качество жизни мышей (состояние/поведение), в также гибель от возможной токсичности, ожидаемой от непрогнозируемых для нового объекта причин.

**Статистическая обработка данных.** Величина Т-теста в сравниваемых группах, полученная при расчете критерия Фишера с помощью компьютерных программ Excel 2013 и Excel для Windows 2007, свидетельствовала о достоверности различий при  $p < 0,05$ .

**Завершение экспериментов.** После завершения исследования мышей умерщвляли декапитацией с соблюдением Принципов надлежащей лабораторной практики.

## Результаты и обсуждение

### Сочетание миРНК/антиCD47 + АМ

**Активация макрофагов человека.** Опухолевые клетки модифицировали методом липофекции миРНК для снижения уровня экспрессии рецептора CD47. Макрофаги выделяли из образцов лейкоцитарной взвеси здоровых доноров, полученной из отделения переливания крови НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и активировали по данной методике [14]. Изучение жизнеспособности и фенотипа макрофагов показало, что при окрашивании трипановым синим количество живых клеток составляет в среднем 98,2 %, а цитотоксическая активность АМ реализуется при соотношении «опухолевые клетки/макрофаги» 1:1. Методика приведена подробно из-за определенной ранее вариабельности жизнеспособности. АМ представляют собой клетки, характерные для моноцитов человека и одновременно экспрессирующие в  $44 \pm 2,8$  % случаев молекулы CD14 ( $45 \pm 5,2$  %), CD56 ( $10 \pm 9,4$  %), а также CD11c (доля  $46 \pm 7,5$  %).

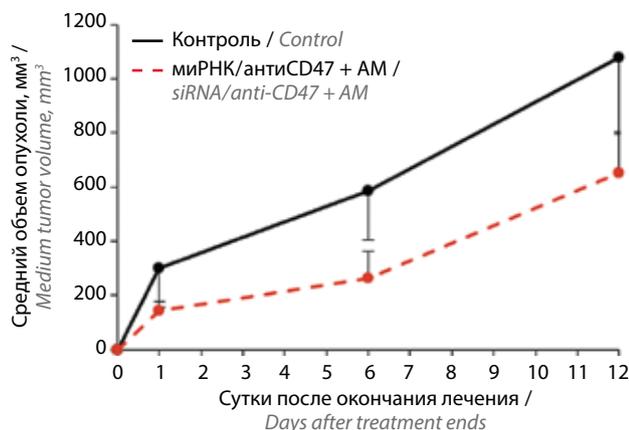
**Действие на рост опухоли.** Показано, что в группе КРО в процессе роста размеры опухоли варьируют от  $V_{cp} = 299 \pm 145$  до  $V_{cp} = 587 \pm 184$  мм<sup>3</sup>, Т/С = 100 %. Скорость роста опухоли к окончанию опыта составила  $[V_{III}/V_{II}] = 3,6$ , что свидетельствует о начале экспоненциальной фазы роста. В группе миРНК/антиCD47 + 6 ч + АМ слабый и незначимый эффект

получен только на 6-е сутки после окончания курса,  $T/C = 45\%$  против критерия  $T/C \leq 42\%$ . Динамика роста опухоли слабо положительная  $[V_{III}/V_{II}] = 2,1$  (рис. 1) и характерна для кратковременной стабилизации процесса. Кривые роста опухоли наглядно иллюстрируют динамику описанных процессов. Переносимость миРНК/антиCD47 + 6 ч + АМ в изученной схеме и дозах при 3-кратном внутривенном введении через 48 ч была удовлетворительной, без побочных эффектов.

**Сочетание миРНК антиMCM4/антиLIVIN + OXP**

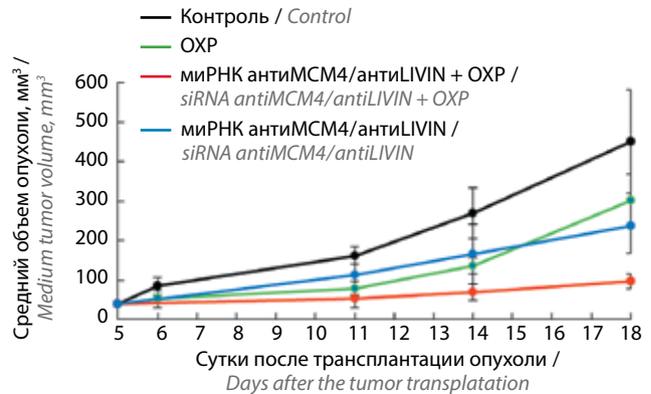
**Действие на рост опухоли.** В группе КРО подкожные ксенографты РТК-8 без лечения в течение 18 дней роста увеличились от  $V_{cp} = 84 \pm 21$  до  $V_{cp} = 451 \pm 131$  мм<sup>3</sup>. В группе миРНК антиMCM4/антиLIVIN + OXP в течение 12 дней после окончания лечения получен значимый и достоверный противоопухолевый эффект на уровне  $T/C = 33, 26$  и  $21\%$  соответственно ( $p < 0,05$ ). Переносимость воздействия в изученных схемах и дозах при внутривенном введении была удовлетворительной, без побочных эффектов. В группах монотерапии на адекватные сроки эффект был слабым и находился ниже порогового уровня ( $T/C \leq 42\%$ ),  $T/C = 62/67$  и  $T/C = 69/53\%$  ( $p > 0,05$ ). Кривые роста опухолей адекватно иллюстрируют динамику описанных процессов (рис. 2, 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что сочетание миРНК антиMCM4/антиLIVIN + OXP с предварительным длительным (на 5–9-й дни после трансплантации) введением дуплекса и последующим (через 1 сут) введением цитостатика оказалось эффективным. Положительная динамика торможения роста опухоли во времени после сочетанной терапии со значимым снижением  $T/C = 33\%$  до  $T/C = 21\%$



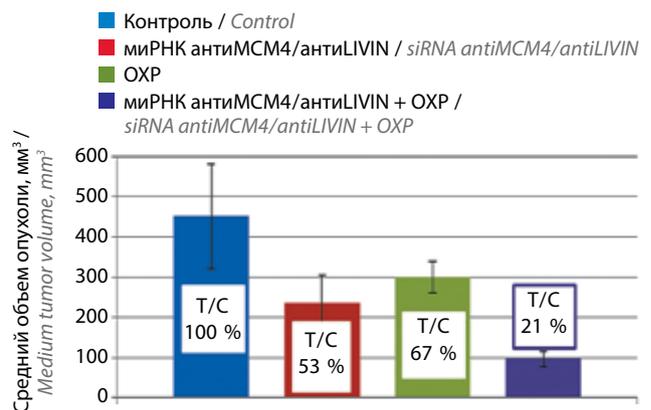
**Рис. 1.** Динамика роста подкожного ксенографта Rpoch-1 под действием миРНК/антиCD47 + активированные макрофаги человека (АМ) в режиме 3-кратного внутривенного введения

**Fig. 1.** Dynamics of Rpoch-1 subcutaneous xenograft growth under the action of siRNA/anti-CD47 + activated human macrophages (AM) in the mode of 3-fold intravenous administration



**Рис. 2.** Динамика роста подкожных ксенографтов рака толстой кишки человека РТК-8 у мышей-самцов Balb/c nude при адъювантной терапии миРНК антиMCM4/антиLIVIN + оксалиплатин (OXP)

**Fig. 2.** Growth dynamics of subcutaneous human colon cancer xenografts RTK-8 in male Balb/c nude mice with adjuvant therapy of antiMCM4/antiLIVIN + oxaliplatin (OXP) siRNA



**Рис. 3.** Сравнительная эффективность адъювантной терапии миРНК антиMCM4/антиLIVIN + оксалиплатин (OXP) на подкожных ксенографтах рака толстой кишки человека РТК-8 на 12-е сутки после лечения. T/C – treatment/control (лечение/контроль).

**Fig. 3.** Comparative efficacy of adjuvant therapy with antiMCM4/antiLIVIN + oxaliplatin (OXP) siRNA against subcutaneous human colon cancer xenografts RTK-8 on day 12 after treatment. T/C – treatment/control

(критерий  $T/C < 42\%$ ) привела к минимальному объему опухолевых узлов 400 мм<sup>3</sup> через 3 нед. В сравнении с применением компонентов сочетания в монорежиме, не оказавшем значимого ингибирующего действия в использованных режимах,  $T/C > 49\%$ . Это позволяет считать, что примененная в адъювантном режиме миРНК антиMCM4/антиLIVIN + OXP при лечении малочувствительной к OXP опухолевой модели может существенно повысить противоопухолевый эффект цитостатика при его максимальной дозировке. С учетом направленности дуплекса на контроль клеточного цикла можно рассматривать реставрацию апоптоза выживших после цитостатика и находящихся в интерфазе клеток как возможный механизм адъювантного усиления ингибирующего действия [15].

### Заключение

Доклинические исследования на опухолях человека *in vivo* 2 ориентированных на определенные онкомишени парентеральных миРНК выявили некоторые характеристики их действия в адъювантном режиме для иммуно/химиотерапии. Отсутствие терапевтического выигрыша цитотоксичных АМ на модели рака почки человека Рпоч-1/CD47<sup>+</sup> при сочетании с направленной на реставрацию макрофагального звена миРНК/антиCD47 не дает основания для положительной оценки адъювантных свойств этого агента. Однако установленные переносимые дозовые и временные характеристики между компонентами открывают возможность поиска ожидаемо-

го эффекта путем оптимизации схемы сочетанного воздействия, возможно, при другой локализации процесса, например, при меланоме кожи. Направленная на «выключение» контролирующих целостность генома генов-ингибиторов композиция миРНК антиМСМ4/антиLIVIN показала способность двукратно усиливать ингибирующее действие алкилирующего цитостатика ОХР на малочувствительной модели рака толстой кишки РТК-8. Предположено, что адъювантный эффект возникает благодаря синхронизации клеток в S-фазе без выхода в митоз. Эта композиция может рассматриваться как потенциальный адъювант для специфической противоопухолевой химиотерапии циклозависимыми агентами.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Setten R.L., Rossi J.J., Han S.P. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics. *Nature reviews. Drug Discovery* 2019;18(6):421–46. DOI: 10.1038/s41573-019-0017-4
2. Hu B., Zhong L., Weng Y. et al. Therapeutic siRNA: state of the art. *Sig Transduct Target Ther* 2020;5(1):101. DOI: 10.1038/s41392-020-0207-x
3. Oh B.Y., Kim K.H., Chung S.S., Lee R.A. Silencing the livin gene enhances the cytotoxic effects of anticancer drugs on colon cancer cells. *Ann Surg Treat Res* 2016;91(6):273–7. DOI: 10.4174/ast.2016.91.6.273
4. Choi M.J., Kang S.J., Lee Y.K. et al. Novel lipid nanocomplex co-carrying Bcl2 siRNA and quantum dots for EGF receptor-targeted anti-cancer theranosis. *Int J Mol Sci* 2024;25(11):6246. DOI: 10.3390/ijms25116246
5. Li Y., Zou J., Zhang Q. et al. Systemic analysis of the DNA replication regulator MCM complex in ovarian cancer and its prognostic value. *Front Oncol* 2021;11(68):1261–8. DOI: 10.3389/fonc.2021.681261
6. Kim W., Ye Z., Simonenko V. et al. Codelivery of TGFβ and Cox2 siRNA inhibits HCC by promoting T-cell penetration into the tumor and improves response to Immune Checkpoint Inhibitors. *NAR Cancer* 2024;6(1):zcad059. DOI: 10.1093/narcan/zcad059
7. Lee J.W., Yoon H.Y., Ko Y.J. et al. Dual-action protein-siRNA conjugates for targeted disruption of CD47-signal regulatory protein α axis in cancer therapy. *ACS nano* 2024;18(33):22298–315. DOI: 10.1021/acsnano.4c06471
8. Bartlett D.W., Davis M.E. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 2006;34(1):322–33. DOI: 10.1093/nar/gkj439
9. Luneva A.S., Puchkov P.A., Shmendel E.V. et al. Optimization of the technology for the preparation of cationic liposomes for the delivery of nucleic acids. *Russ J Bioorg Chem* 2018;44(6):724–31. DOI: 10.1134/S1068162019010084
10. Soriano P.A., Liu N., Castillo E. et al. Oxaliplatin but not irinotecan impairs posthepatectomy liver regeneration in a murine model. *Int J Hepatol* 2011;2011:490463. DOI: 10.4061/2011/490463
11. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):6–12. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13  
Treshalina H.M. Immunodeficient Balb/c nude mice and modeling of different tumor growth variants for preclinical studies. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(3):6–12. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13
12. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. М.: Практическая медицина, 2009. 171 с.  
Treshalina H.M. Collection of human tumor strains. Moscow: Practical Medicine, 2009. 171 p. (In Russ.).
13. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. М.: Гриф и К, 2012. Ч. 1. С. 642–657.  
Treshalina H.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Guidelines for preclinical study of antitumor activity of drugs. In: *Guidelines for preclinical studies of drugs*. Moscow: Grif i K, 2012. Part 1. P. 642–657. (In Russ.).
14. Lewis B.M., Patial S., Saini Y. *In vitro* screening method for characterization of macrophage activation responses. *Methods Protoc* 2022;5(5):68. DOI: 10.3390/mps5050068
15. Карпухин А.В., Алимов А.А., Маслов М.А., Кузеванова А.Ю. Композиция для ингибирования роста и стимуляции апоптоза клеток колоректального рака. Патент RU 2 644 675(13) C1. 2018.  
Karpukhin A.V., Alimov A.A., Maslov M.A., Kuzevanova A.Yu. Composition for inhibition of growth and stimulation of apoptosis of colorectal cancer cells. Patent RU 2 644 675 (13) C1. 2018. (In Russ.).

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность сотруднику лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» М.А. Маслову за любезно предоставленную для исследований субстанцию.

**Acknowledgements.** The authors express their gratitude to M.A. Maslov, a member of the Laboratory of Molecular Genetics of Complexly Inherited Diseases, Research Centre for Medical Genetics for kindly providing the substance for research.

#### **Вклад авторов**

Е.М. Трещалина: разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных литературы и экспериментальных данных, написание и редактирование рукописи;

Г.Б. Смирнова: подготовка и выполнение экспериментов на животных, получение и статистическая обработка данных, составление иллюстраций;

А.Ю. Кузеванова: проведение экспериментов на культурах злокачественных клеток, получение и обработка данных, статистическая обработка результатов, составление иллюстраций;

С.Ш. Каршиева: подготовка экспериментов на культурах злокачественных клеток, анализ и составление иллюстраций;

М.В. Киселевский: разработка концепции исследования, подготовка и проведение экспериментов на культуре активированных макрофагов человека;

А.В. Карпухин: разработка концепции исследования, подготовка данных литературы и руководство работой по подготовке агента для экспериментальных исследований с моделью колоректального рака человека, анализ полученных данных;

М.А. Маслов: разработка концепции исследования, подготовка данных литературы, получение липосом;

А.А. Алимов: разработка концепции исследования, подготовка данных литературы и подготовка агентов для экспериментальных исследований с моделями злокачественного роста, анализ полученных данных.

#### **Author's contributions**

H.M. Treshalina: development of research concept and design, literature collection and analysis article data preparation, drafting and editing the manuscript;

G.B. Smirnova: preparation and execution of experiments on animals, obtaining and statistical processing of data, drawing up illustrations;

A.Yu. Kuzevanova: conducting experiments on cultures of malignant cells, obtaining and processing data, statistical processing of results, drawing up illustrations;

S.Sh. Karshieva: preparation of experiments on cultures of malignant cells, analysis and drawing up illustrations;

M.V. Kiselevskiy: development of research concept, preparation and conduct of experiments on culture of activated human macrophages;

A.V. Karpukhin: development of research concept, preparation of literature data and guidance on the preparation of an agent for experimental studies with a human colorectal cancer model, analysis of the data obtained;

M.A. Maslov: development of research concept, preparation of literature data, liposome preparation;

A.A. Alimov: development of research concept, preparation of literature data and preparation of agents for experimental studies with malignant growth models, analysis of the data obtained.

#### **ORCID авторов / ORCID of authors**

Е.М. Трещалина / H.M. Treshalina: <https://orcid.org/0000-0002-3878-3958>

Г.Б. Смирнова / G.B. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0002-4599-7284>

А.Ю. Кузеванова / A.Yu. Kuzevanova: <https://orcid.org/0000-0001-6156-9725>

С.Ш. Каршиева / S.Sh. Karshieva: <https://orcid.org/0000-0003-2469-2315>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

А.В. Карпухин / A.V. Karpukhin: <https://orcid.org/0000-0002-7001-9116>

М.А. Маслов / M.A. Maslov: <https://orcid.org/0000-0002-5372-1325>

А.А. Алимов / A.A. Alimov: <https://orcid.org/0000-0002-8495-7728>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова».

**Funding.** The work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Education and Science of Russia for the Research Centre for Medical Genetics.

**Соблюдение правил биоэтики.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» (протокол № 1 от 04.04.2023).

**Conformity of the principles of bioethics.** The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes. The Committee on Bioethics of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology approved the protocol of the study (Protocol No. 1 dated 04.04.2023).

Статья поступила: 21.03.2025. Принята в печать: 13.05.2025. Опубликовано онлайн: 27.06.2025.

Article submitted: 21.03.2025. Accepted for publication: 13.05.2025. Published online: 27.06.2025.