

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

Российский Биотерапевтический Журнал
2022 • Том 21 • № 3



**Russian Journal
of Biotherapy**

3

**ТОМ 21
2022**

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

теоретический и научно-практический рецензируемый журнал

Основная задача издания – публикация информации о современных достижениях в области изучения патогенеза, диагностики и терапии иммуноопосредованных и онкологических заболеваний, результатов научных исследований, национальных и международных доклинических и клинических исследований.

Цели журнала – информирование читателя о результатах изучения новых биомаркеров онкологических и иммуноопосредованных заболеваний, использования биомаркеров в диагностике и терапии злокачественных новообразований и патологий иммунной системы, исследований в области лекарственной и клеточной терапии, а также по вопросам технологии создания лекарств, биомедицинских клеточных продуктов и биоматериалов, проведения доклинических и клинических исследований новых препаратов и методов лечения; обобщение научных и практических достижений в области диагностики и терапии иммунологических и онкологических заболеваний.

ОСНОВАН В 2002 г. профессором А.Ю. Барышниковым

3 ^{ТОМ 21}
'22

Учредитель:
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Адрес учредителя и редакции:
115522, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 2.

Тел.: +7 (499) 324-10-65
Факс: +7 (499) 324-22-74

E-mail: bioterapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

Адрес издательства:
115478, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 15, НИИ
канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru

www.abvpress.ru

Редактор Е.М. Печерская
Корректор Е.С. Самойлова

Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых
коммуникаций. Регистрационный
номер: № 77-11695 от 21.01.2002 г.,
ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013 г.*

При полной или частичной
перепечатке материалов
ссылка на журнал «Российский
биотерапевтический журнал»
обязательна.

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)

Российский биотерапевтический журнал.
2022. Том 21. № 3. 1–92.

Сдано в печать: 00.10.2022.

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2022

Подписной индекс в каталоге агентства
«Роспечать» — 81679.

Отпечатано в типографии «Мэйл Текнолоджи».
105082, Москва, Переведеновский пер., 13, стр. 16.

Тираж 1000 экз. Бесплатно.

<http://bioterapevt.elpub.ru>

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Киселевский Михаил Валентинович, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Караулов Александр Викторович, академик РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Шпрах Зоя Сергеевна, к.фарм.н., заведующая лабораторией химико-фармацевтического анализа ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, доцент кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Соколова Зинаида Александровна, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Балдуева Ирина Александровна, д.м.н., доцент, заведующая научным отделом онкоиммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Бунятян Наталья Дмитриевна, д.фарм.н., профессор, главный научный сотрудник Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, заведующая кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Голенков Анатолий Константинович, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, профессор кафедры терапии, врач-гематолог отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (Москва, Россия)

Евсегнеева Ирина Валентиновна, д.м.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Краснов Виктор Павлович, д.х.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией асимметрического синтеза Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН (Екатеринбург, Россия)

Меерович Игорь Геннадьевич, к.б.н., научный сотрудник департамента фармации Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Каламазу, США)

Мисюрин Андрей Витальевич, д.б.н., генеральный директор ООО «Генотехнология» (Москва, Россия)

Набиев Игорь Руфаилович, д.х.н., профессор, профессор лаборатории по исследованиям в области нанонаук Реймского университета (Реймс, Франция), ведущий ученый лаборатории нано-биоинженерии Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (Москва, Россия)

Новиков Виктор Владимирович, д.б.н., профессор, профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, заведующий лабораторией иммунохимии ФБУН «Нижегородский Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» (Нижний Новгород, Россия)

Оборотова Наталия Александровна, д.фарм.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Панкратов Андрей Александрович, к.б.н., руководитель отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии Московского научного исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Петров Александр Юрьевич, д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармации и химии Уральского государственного медицинского университета (Екатеринбург, Россия)

Рапопорт Наталья Яковлевна, д.х.н., профессор, почетный профессор департамента биомедицинской инженерии Университета Юты (Солт-Лейк-Сити, США)

Соколова Татьяна Михайловна, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., советник вице-президента РАН (Москва, Россия)

Титов Константин Сергеевич, д.м.н., профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», президент АНО «Национальный Альянс специалистов по опухолям наружных локализаций» (Москва, Россия)

Уласов Илья Валентинович, д.б.н., ведущий научный сотрудник, лидер группы экспериментальной биотерапии и диагностики Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Эстрин Юрий Захарович, д.ест.н., почетный доктор РАН, действительный член Австралийской академии наук, иностранный член РАН, профессор департамента материаловедения и инжиниринга Университета им. Монаша (Клэйтон, Австралия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Барышников Мария Анатольевна, к.фарм.н., заведующая лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Бочарова Ольга Алексеевна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией иммунофармакологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Демидов Лев Вадимович, д.м.н., профессор, заведующий хирургическим отделением № 10 биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Иванов Павел Константинович, д.м.н., заведующий лабораторией медицинской биотехнологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кадагидзе Заира Григорьевна, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник централизованного клинико-лабораторного отдела ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Косоруков Вячеслав Станиславович, к.б.н., директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Тупицын Николай Николаевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии гемопоза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Шубина Ирина Жановна, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses). Journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

Russian Journal of Biotherapy

Peer-reviewed theoretical and SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

The main objective of Russian Journal of Biotherapy is a publication of current achievements in the study of pathogenesis, diagnostics, and therapy of immune-mediated and oncological diseases, results of the research studies, and results of national and international pre-clinical and clinical studies.

The publication aim is to present the results of the studies of new biomarkers of oncological and immune diseases, the use of biomarkers in diagnostics and therapy of tumors and disorders of the immune system, studies in the field of drug and cell therapy, studies of drug development technologies, biomedical cell products and biomaterials, pre-clinical and clinical studies of new medicines and methods of treatment. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of immunological and oncological diseases therapy.

FOUNDED IN 2002 by Professor A.Yu. Baryshnikov

3^{VOL. 21}
'22

Founder:

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation

Founder and editorial office:

Bld. 2, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522.

Tel.: +7 (499) 324-10-65
Fax: +7 (499) 324-22-74

e-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

Publishing office:

Research Institute of Carcinogenesis, Floor 3, Bld. 15, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478.

Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru

www.abvpress.ru

Editor E.M. Pecherskaya
Proofreader E.S. Samoylova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

The journal is registered at the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media
Registration number: ПИ № 77-11695 dated 21.01.2002;
ПИ № ФС 77-53039 dated 04.03.2013

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal".

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2022. Volume 21.
No 3. 1–92. Submitted: 00.10.2022.
© PH "ABV-Press", 2022
Rospechat' catalogue index: 81679.
Printed at the Mail Technology Ltd
Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane, Moscow 105082.
1,000 copies. Free distribution
<http://bioterapevt.elpub.ru>

EDITOR-IN-CHIEF

Mikhail V. Kiselevskiy, PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

DEPUTIES EDITOR-IN-CHIEF

Alexander V. Karaulov, Academician of the Russian Academy of Sciences, PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Zoya S. Shprakh, PhD, Head of Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Analysis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Associate Professor of Chair of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Zinaida A. Sokolova, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Irina A. Baldueva, PhD, DSc, Associate Professor, Head of Research Department of Oncoimmunology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

Natalia D. Bunyatyan, PhD, DSc, Professor, Major Researcher of Center of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of Russia, Head of Chair of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Anatoly K. Golenkov, MD, PhD, DSc, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Professor of Chair of Therapy, Doctor Hematologist of Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirsky Moscow Region Scientific Research Clinical Institute (MONIKI) (Moscow, Russia)

Irina V. Evsegneeveva, MD, PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Viktor P. Krasnov, PhD, DSc, Professor, Major Researcher, Head of Laboratory of Asymmetrical Synthesis, I. Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences (Ekaterinburg, Russia)

Igor G. Meerovich, PhD, Scientist II of Pharma Department, Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Kalamazoo, USA)

Andrey V. Misyurin, PhD, DSc, General Director of LLC «GeneTechnology» (Moscow, Russia)

Igor R. Nabiev, PhD, DSc, Professor, Professor of Laboratory of Studies in the Field of Nanoscience, University of Reims (Reims, France), Leading Scientist of Laboratory Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute) (Moscow, Russia)

Viktor V. Novikov, PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Molecular Biology and Immunology of the Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky Nizhgorodsky State University, Head of Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Nizhniy Novgorod, Russia)

Natalia A. Oborotova, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of Laboratory of Development of Drug Forms, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Andrey A. Pankratov, PhD, Chief of Department of Modifiers and Protectors of Anti-tumor Therapy, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Alexander Yu. Petrov, PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Pharmacy, Ural's State Medical University (Ekaterinburg, Russia)

Natalya Ya. Rapoport, Ph. D., DSc., Research Professor Emerita, Department of Biomedical Engineering, University of Utah (Salt Lake City, USA)

Tatiana M. Sokolova, PhD, DSc, Leading Researcher of Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Eugenia V. Stepanova, PhD, DSc, Advisor to the Vice-President of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

Konstantin S. Titov, MD, PhD, DSc, Professor of Department of Oncology and Radiology of the Institute of Medicine, RUDN University, President of the National Alliance of Specialists in Tumors of External Localization (Moscow, Russia)

Ilya V. Ulasov, PhD, DSc, *Leading Researcher, Leader of the Experimental Biotherapy and Diagnostics Group of the Institute of Regenerative Medicine, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)*

Yuri Z. Estrin, PhD, DSc, *Honorary Doctor of the Russian Academy of Sciences, Fellow of the Australian Academy of Science, Foreign member of the Russian Academy of Sciences, Professor of Department of Materials Science and Engineering, Monash University (Clayton, Australia)*

EDITORIAL COUNCIL

Maria A. Baryshnikova, PhD, *Head of Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Olga A. Bocharova, PhD, DSc, *Professor, Head of Laboratory of Immunopharmacology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Lev V. Demidov, MD, PhD, DSc, *Professor, Head of Surgical Department No 10 of Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Pavel K. Ivanov, PhD, DSc, *Head of Laboratory of Medical Biotechnology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Zaira G. Kadagidze, MD, PhD, DSc, *Professor, Leading Researcher of Centralized Clinical-Laboratory Department, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Vyacheslav S. Kosorukov, PhD, *Director of Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Irina Yu. Kubasova, PhD, *Scientific Registrar, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Nikolay N. Tupitsyn, PhD, DSc, *Professor, Head of Laboratory of Immunology of Hematopoiesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Irina Zh. Shubina, PhD, DSc, *Leading Researcher, Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

К.М. Коноплина, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков

Актуальные подходы к оценке биологической активности иммуноцитоккинов в условиях *in vitro*10

О.А. Бочарова, Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров, А.А. Аксенов, В.Г. Кучеряну, А.В. Ревущин, Г.В. Павлова, Н.Е. Кушлинский

Линейные мыши CBA как модель спонтанного канцерогенеза23

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А.А. Вартамян, Ю.А. Хоченкова, В.С. Косоруков

CD437 повышает захват железа клетками метастатической меланомы34

Н.С. Мартыненко, Н.Ю. Анисимова, М.В. Киселевский, О.В. Рыбальченко, Д.Р. Темралиева, Д.В. Просвирнин, С.В. Пивоварчик, Д.В. Филоненко, С.В. Добаткин

Исследование биосовместимости *in vitro* ультрамелкозернистых биорезорбируемых сплавов на основе Zn40

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

Влияние цифетрилина на экспрессию рецепторов к соматостатину в перевиваемой опухоли Са-755 мышей50

Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева, З.С. Шпрах, А.П. Колпаксиди, М.В. Дмитриева, А.В. Ланцова, Л.Л. Николаева, И.Р. Просалкова

Количественное определение N-гликозидного производного замещенного индоло[2,3a]карбазола в инновационных лекарственных формах61

П.А. Быстров, К.М. Новрузов, М.П. Потапнев, С.М. Космачева, Н.Ю. Анисимова, М.В. Киселевский, П.С. Мышелова, И.Н. Булыгина, Ф.С. Сенатов

Эффективность стерилизации пучком ускоренных электронов гидрогеля для 3D-культивирования мезенхимальных мультипотентных клеток72

М.А. Барышникова, А.В. Пономарев, А.А. Рудакова, З.А. Соколова, Н.В. Голубцова, П.В. Царапаев, Г.М. Левагина, Е.Д. Даниленко, В.С. Косоруков

Сравнение Ридостина Про и Poly(I:C) в качестве адъюванта для противоопухолевой неоантигенной пептидной вакцины82

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ90

REVIEWS

- Ksenia M. Konoplina, Ekaterina N. Kosobokova, Vyacheslav S. Kosorukov*
Current approaches to assessing the biological activity of immunocytokines *in vitro*10
- Olga A. Bocharova, Regina V. Karpova, Evgeniy V. Bocharov, Andrey A. Aksyonov, Valerian G. Kucheryanu, Alexander V. Revishchin, Galina V. Pavlova, Nikolay E. Kushlinsky*
CBA strain mice as a model of spontaneous carcinogenesis23

ORIGINAL REPORTS

- Amalia A. Vartanian, Yulia A. Khochenkova, Vyacheslav S. Kosorukov*
CD437 increases the iron uptake by metastatic melanoma cells34
- Natalia S. Martynenko, Natalia Yu. Anisimova, Mikhail V. Kiselevskiy, Olga V. Rybalchenko, Diana R. Temralieva, Dmitry V. Prosvirnin, Svetlana V. Pivovarchik, Dmitrii V. Filonenko, Sergey V. Dobatkin*
Study of biocompatibility *in vitro* of ultrafine-grained Zn-based bioresorbable alloys40
- Marina P. Kiseleva, Larisa M. Borisova, Vera V. Delektorskaya, Zoya S. Shprakh, Svetlana V. Ustinkina, Irina Yu. Kubasova*
Cyphetrylin effect on somatostatin receptors expression in transplantable Ca-755 mice tumor50
- Elena V. Ignatieva, Irina V. Yartseva, Zoya S. Shprakh, Alexander P. Kolpaksidi, Mariya V. Dmitrieva, Anna V. Lantsova, Lyudmila L. Nikolaeva, Irina R. Prosalkova*
Quantitative determination of the N-glycoside derivative of substituted indolo[2,3a]carbazole in innovative dosage forms61
- Peter A. Bystrov, Keryam M. Novruzov, Mikhail P. Potapnev, Svetlana M. Kosmacheva, Natalia Yu. Anisimova, Mikhail V. Kiselevskiy, Polina S. Myshelova, Inna N. Bulygina, Fedor S. Senatov*
Efficiency of accelerated electron beam sterilization of a hydrogel for 3D cultivation of mesenchymal multipotent cells72
- Maria A. Baryshnikova, Alexander V. Ponomarev, Anna A. Rudakova, Zinaida A. Sokolova, Natalya V. Golubtsova, Pavel V. Tsarapayev, Galina M. Levagina, Elena D. Danilenko, Vyacheslav S. Kosorukov*
Comparison of Ridostin Pro and Poly(I:C) as adjuvant for a cancer neoantigen peptide vaccine82

INFORMATION FOR AUTHORS90

Актуальные подходы к оценке биологической активности иммуноцитокинов в условиях *in vitro*

К.М. Коноплина, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков

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

Контакты: Ксения Михайловна Коноплина konoplinakm@gmail.com

Применение цитокинов в качестве противоопухолевых препаратов ограничено их токсичностью и побочными эффектами системного введения. Одним из способов снижения токсичности и повышения терапевтического индекса является применение их в виде конъюгатов с антителами – иммуноцитокинов. Результаты доклинических исследований показали повышенную эффективность и сниженную токсичность различных иммуноцитокинов по сравнению с исходными, неконъюгированными, цитокинами. Потенциал иммуноцитокинов как противоопухолевых препаратов в настоящее время изучается в рамках клинических исследований. Терапевтическая эффективность иммуноцитокинов зависит от их физико-химических параметров, определяющих биораспределение *in vivo*, и биологической активности как результата используемых в дизайне механизмов действия антительного и цитокинового участков. Для характеристики биологической активности иммуноцитокинов на раннем этапе исследования необходимы методы, позволяющие оценить биологическую активность как отдельных участков, так и целой молекулы иммуноцитокина.

В настоящем обзоре рассматриваются существующие подходы к оценке биологической активности иммуноцитокинов *in vitro* в ходе доклинических исследований: с использованием монослойных клеточных культур, репортерных клеточных систем, совместных культур, трехмерных (3D) моделей опухолей. Монослойных культур достаточно для подтверждения используемого в дизайне иммуноцитокина механизма действия его отдельных участков, и тест-системы «золотого стандарта» для определения специфической биологической активности цитокина и эффекторных функций антительного участка остаются востребованными. Коммерческие репортерные клеточные системы являются альтернативным вариантом оценки биологической активности цитокинового и антительного участков на уровне активации сигнальных путей. Совместные культуры опухолевых и эффекторных клеток позволяют оценить цитотоксический и иммуномодулирующий эффекты антительного и цитокинового участков без использования методов 3D-культивирования. Использование 3D-моделей опухолей позволяет заменить несколько тестов на биологическую активность отдельных участков иммуноцитокина, проводимых на монокультурах и совместных культурах, на одно комплексное исследование, однако такие модели требуют значительных временных и материальных затрат.

Ключевые слова: иммуноцитокин, биологическая активность, механизм действия

Для цитирования: Коноплина К.М., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. Актуальные подходы к оценке биологической активности иммуноцитокинов в условиях *in vitro*. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3): 10–22. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-10-22

Current approaches to assessing the biological activity of immunocytokines *in vitro*

Ksenia M. Konoplina, Ekaterina N. Kosobokova, Vyacheslav S. Kosorukov

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

Contacts: Ksenia Mikhailovna Konoplina konoplinakm@gmail.com

The use of cytokines as anticancer drugs is limited due to their toxicity. It is possible to reduce toxicity and to increase the therapeutic index by using cytokines in the form of conjugates with antibodies – immunocytokines. The results of preclinical studies have shown increased efficacy and reduced toxicity of various immunocytokines compared to the original, unconjugated cytokines. The potential of immunocytokines as anticancer agents is currently being studied in clinical trials. The therapeutic efficacy of immunocytokines depends on their physicochemical parameters, which determine the *in vivo* biodistribution, and biological activity as a result of the mechanisms

of the antibody action and cytokine sites incorporated in the design. There is a need for methods that allow to assess the biological activity of both individual sites and the entire immunocytokine molecule when characterizing immunocytokines at an early stage of research.

This review considers the existing approaches for assessing the biological activity of immunocytokines *in vitro* in the course of preclinical studies, such as monolayer cultures, reporter cell lines, co-cultures, three-dimensional (3D) tumor models. Monolayer cultures are sufficient to confirm the mechanism of action of separate sites of immunocytokines used in the design, and the “gold standard” test systems for determining the specific biological activity of the cytokine and the effector functions of the antibody site remain in demand. Commercial reporter cell lines remain an alternative option for assessing the biological activity of cytokine and antibody sites at the level of activation of signaling pathways. Co-cultures of tumor and effector cells make it possible to evaluate the cytotoxic and immunomodulatory effects of antibody and cytokine sites without using 3D cultivation methods. The use of 3D tumor models makes it possible to replace several tests for the biological activity of separate sites of immunocytokines conducted on monolayer cultures and co-cultures with one comprehensive study, however, such models require significant time and material costs.

Keywords: immunocytokine, biological activity, mechanism of action

For citation: Konoplina K.M., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Current approaches to assessing the biological activity of immunocytokines *in vitro*. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022; 21(3):10–22. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-10-22

Введение

Применение цитокинов в высоких дозах является одним из вариантов противоопухолевой иммунотерапии [1, 2], однако использование цитокинов в терапевтических дозах сопровождается системной токсичностью и побочными эффектами. Один из способов повышения эффективности действия цитокинов и снижения их токсичности — таргетная доставка в опухоль с помощью антитела. Такие конъюгаты на основе антител и цитокинов, названные иммуноцитокинами (ИЦ), начали разрабатывать с начала 1990-х годов.

Общая концепция механизма действия противоопухолевого иммунотерапевтического ИЦ заключается в следующем. За счет антительного участка, таргетированного к антигену на поверхности опухолевой клетки либо к мишени в микроокружении опухоли, ИЦ накапливается в опухоли. Здесь цитокин, связываясь с соответствующими рецепторами на поверхности опухолевой и/или иммунной клетки, передает сигнал внутрь клетки и индуцирует противоопухолевый ответ. В зависимости от свойств используемого цитокина противоопухолевый ответ может быть обусловлен как прямым действием цитокина на опухолевую клетку, так и действием цитокина на иммунные клетки в микроокружении опухоли с последующей индукцией иммунного ответа на опухоль. Помимо этого, ИЦ может оказывать противоопухолевый эффект за счет антительного участка (см. рисунок): в случае сохранения одной либо нескольких эффекторных функций и/или наличия блокирующей функции при таргетированности антительного участка к рецептору фактора роста (например, HER2/неу).

За последние 30 лет получено и протестировано в условиях *in vitro* и на различных мышиных моделях опухолей более 100 ИЦ [3]. Более 10 ИЦ разного

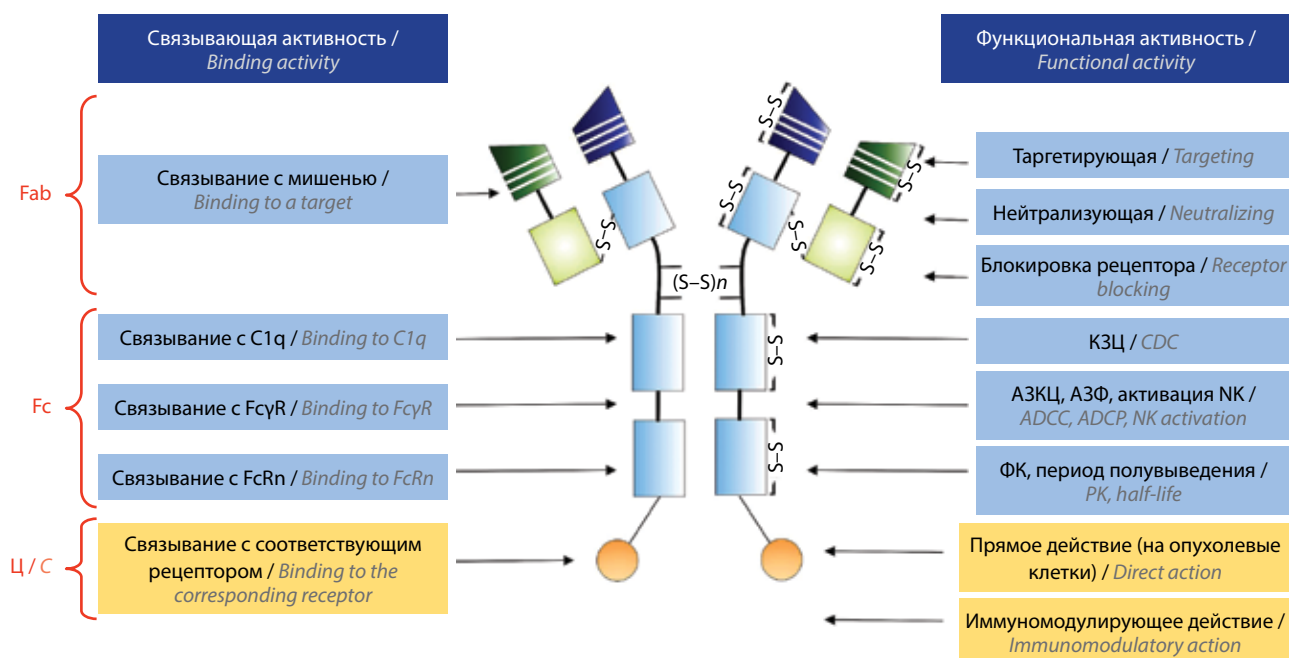
формата на основе интерферона (IFN) α , интерлейкинов (IL) 2, 12 и фактора некроза опухоли (TNF) в настоящее время находятся в фазах I–III клинических испытаний [4, 5]. Несколько клинических испытаний ИЦ были преждевременно закончены по причине недостаточного набора пациентов [5] либо по решению спонсора [6], и на момент 2022 г. нет ИЦ, одобренных регуляторными органами для клинического применения.

Распространенный подход к доклинической характеристике ИЦ как потенциальных противоопухолевых препаратов заключается в определении биологической активности цитокинового и антительного участков по отдельности с помощью традиционных клеточных тест-систем. Иммунотерапевтическое действие ИЦ, как и других кандидатных противоопухолевых препаратов, оценивают с помощью мышиных моделей опухолей, имеющих определенные ограничения [7].

В настоящем обзоре рассматриваются существующие подходы к оценке биологической активности ИЦ *in vitro* в ходе доклинических исследований: с использованием монослойных клеточных культур, репортерных клеточных систем, совместных культур, 3D-моделей опухолей. Анализируется выбор методов для оценки биологической активности ИЦ в зависимости от используемых в дизайне функций антительного и цитокинового участков.

Краткие сведения об иммуноцитокинах: строение, функции, модификации

Иммуноцитокины представляют собой сложные белковые молекулы на основе моноклонального антитела либо его фрагмента и цитокина; антительный и цитокиновый участки генетически соединены линкером. Терапевтическая эффективность таких сложных



Строение и функции иммуноцитокина на основе полноразмерного иммуноглобулина класса G. АЗКЦ — антителозависимая клеточная цитотоксичность; АЗФ — антителозависимый фагоцитоз; КЗЦ — комплементзависимая цитотоксичность; NK — натуральные киллерные клетки; ФК — фармакокинетика; Ц — цитокин; C1q — компонент комплемента Iq; Fab-фрагмент — антигенсвязывающий фрагмент антитела; FcRn — неонатальный рецептор к Fc-фрагменту иммуноглобулина класса G; FcγR — рецептор к Fc-фрагменту иммуноглобулина класса G; Fc-фрагмент — кристаллизуемый фрагмент антитела

Structure and functions of an immunocytokine based on full-size IgG. ADCC — antibody-dependent cell cytotoxicity; ADCP — antibody-dependent cellular phagocytosis; CDC — complement-dependent cytotoxicity; NK — natural killer cells; PK — pharmacokinetics; C — cytokine; C1q — complement component Iq; Fab — fragment antigen binding; FcRn — neonatal Fc receptor; FcγR — Fc-gamma receptors; Fc — fragment crystallizable

биомолекул в условиях *in vivo* зависит от ряда параметров, среди которых тип мишени, формат и функциональный вариант антительного и цитокинового участков ИЦ, тип линкера между антительным и цитокиновым участками ИЦ, а также доза, режим введения ИЦ и возможность комбинирования с другими типами противоопухолевой терапии [8]. Выбор цитокина, антитела и другие вопросы, возникающие при конструировании ИЦ, подробно рассмотрены в работе Р.А. Young и соавт. [9].

Антительный участок ИЦ, находящихся в клинических исследованиях, представлен химерными, гуманизированными и человеческими полноразмерными иммуноглобулинами (Ig), главным образом подклассов IgG1 и IgG3; полноразмерным IgG с гетеродимерным Fc-фрагментом, полученным по технологии knob-into-hole; вариантами фрагментов антител (главным образом используется одноцепочечный вариабельный фрагмент scFv) в виде моно- и мультимеров [3].

Основная функция антительного участка ИЦ — таргетирующая — одновременно может быть блокирующей, если мишень является антигеном, ассоциированным с опухолью, например: рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2/neu) и др.

В качестве мишеней также используются антигены, расположенные на опухолевых кровеносных сосудах и во внеклеточном матриксе опухоли: альтернативно сплайсированные участки фибронектина А и В, факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) и их рецепторы, раково-эмбриональный антиген СЕА, домен А1 теназина С; исследуются в качестве мишени комплексы ДНК с гистонами (полный перечень см. в обзорах [3]).

Помимо таргетирующей могут быть желательны эффекторные функции антительного участка для улучшения общей противоопухолевой эффективности ИЦ: антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), комплементзависимая цитотоксичность, антителозависимый фагоцитоз (АЗФ), индукция апоптоза, ведущие к лизированию опухолевых клеток. В этом случае ИЦ конструируют на основе полноразмерного IgG либо scFv-Fc, либо мини-антител (два scFv, соединенные с CH3-доменом IgG) [3], при этом возможны модификации Fc-фрагмента, направленные на аффинность связывания с Fcγ-рецепторами на лейкоцитах, для усиления, ослабления определенной эффекторной функции либо ее отмены [10].

Цитокиновый участок при конструировании противоопухолевого ИЦ выбирают, основываясь на эффективности его использования в клинической

практике в отношении определенного спектра опухолей. Противоопухолевая активность цитокинового участка может проявляться как за счет прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки, так и за счет непрямого иммуномодулирующего.

Прямое противоопухолевое действие цитокина может заключаться в подавлении пролиферации, индукции апоптоза, стимуляции экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости I и II типа на поверхности опухолевых клеток [11], а иммуномодулирующее действие — в повышении активности эффекторных иммунных клеток (IL-2, IFN 1-го типа), индукции созревания антигенпрезентирующих клеток (IL-2, 6, 7, 13, 15 [12], IFN 1-го типа), индукции повышенной экспрессии белков, в частности цитокинов (IFN 1-го типа) [11]. Помимо этого, некоторые цитокины в случае применения их с полноразмерными противоопухолевыми антителами способны усиливать функции Fc-фрагмента антитела (АЗКЦ, АЗФ) за счет активации эффекторных клеток (натуральных киллеров (NK), макрофагов) (IFN 1-го типа, IL-2, 12, 15, 21).

За последние несколько лет в составе ИЦ были протестированы более 30 цитокинов: ряд IL (IL-1 β , 2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 13, 15, 17, 18, 21); гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IFN- α , γ и λ ; TNF; цитокины группы TNF; хемокины; различные гетеродимеры цитокинов [3]. В клинических исследованиях в настоящее время находятся ИЦ на основе IFN- α , IL-2, 12 и TNF [3, 4].

Известно, что использование цитокинов в терапевтических дозах сопровождается токсичностью. Проблему представляют побочные эффекты применения цитокинов, обусловленные присутствием цитокиновых рецепторов на нормальных тканях. Для устранения этих недостатков и повышения терапевтического индекса цитокинов разрабатываются различные стратегии «сужения» биологической активности цитокинового участка в составе ИЦ.

Распространенным способом «сужения» активности цитокина является модификация его аффинности к субъединицам соответствующих рецепторов. Так, S.D. Gillies и соавт. [13] с помощью точечной мутации модифицировали IL-2 в составе ИЦ таким образом, чтобы цитокин сохранил способность связываться и активировать только высокоаффинный рецептор IL-2R, состоящий из 3 субъединиц. S.L. Pogue и соавт. [14] методом сайт-направленного мутагенеза ослабили аффинность IFN- α 2b к высокоаффинной цепи рецептора IFNAR—IFNAR2. В работах С. Klein и соавт. [15, 16] с помощью ряда точечных мутаций исключили взаимодействие IL-2 с CD25, α -субъединицей IL-2R и сохранили способность IL-2 связываться только с рецептором промежуточной аффинности.

Стоит отметить, что аффинность цитокина к соответствующим рецепторам в нормальных тканях может не только вызывать системную токсичность, но и препятствовать таргетирующей функции антигенового участка [17–19]; для решения такой проблемы модифицируют не только цитокин (см. выше), но и антигенсвязывающие сайты антигенового участка [15].

Другой способ «сужения» активности цитокина заключается в ее аллостерической регуляции. Было показано, что присоединенный к С-концу легкой цепи IgG цитокин проявляет активность после связывания антигенового участка с соответствующей мишенью [20, 21].

В случае мультимерных цитокинов возможно локализовать активность цитокина с помощью стратегии, основанной на сборке биологически неактивных субъединиц цитокина, генетически сшитых с таргетирующим антителом, в месте опухоли [22].

Используемые в дизайне ИЦ функции антигенового и цитокинового участков (см. рисунок) и их модификации не только задают биологическую активность ИЦ, но также определяют выбор формата клеточной тест-системы для дальнейшей характеристики биологической активности и терапевтической эффективности ИЦ.

Предварительная характеристика новых иммуноцитокинов

Последовательность действий при исследовании нового ИЦ в условиях *in vitro* в общем случае включает следующие этапы. После выделения, очистки и характеристики ИЦ стандартными физико-химическими методами в бесклеточных системах проверяются полнота сборки молекулы ИЦ, лигандсвязывающая способность антигенового и цитокинового доменов.

Характеризацию ИЦ физико-химическими методами можно рассматривать как 1-й этап контроля качества полученного белка, позволяющий обнаружить нежелательные характеристики исследуемой молекулы. Так, с помощью электрофореза в полиакриламидном геле возможно предварительно оценить такие значимые для биораспределения параметры полученного ИЦ, как заряд, молекулярная масса и степень гликозилирования.

Простым и доступным способом подтверждения наличия антигенового и цитокинового доменов являются иммунологические методы, в частности возможно качественное определение обоих доменов одновременно методом иммуноферментного анализа. Например, для доказательства полноты сборки молекулы ИЦ на основе полноразмерного IgG к HER2/neu и IFN- α Е.Н. Кособокова и соавт. [23] разработали метод комбинированного иммуноферментного анализа,

в котором одни антитела были аффинны к IgG человека, другие — к IFN- α . Положительная реакция в такой тест-системе наблюдалась бы только в случае полноразмерного ИЦ, в котором и антительный, и цитокиновый домены связались с соответствующими специфическими антителами. В связи с отсутствием стандартного образца такой метод может дать только качественный результат.

Антигенсвязывающая способность антительного участка оценивается, как правило, методами поверхностного плазмонного резонанса (определяется аффинность связывания антитела с таргетным антигеном, характеризующая константой диссоциации) либо проточной цитометрии. Помимо этого, с целью оценки сохранения эффекторных функций антительного домена возможно проведение тестов (иммунологических либо на аффинность) на связывание с фактором комплемента C1q и с Fc- γ -рецепторами (Fc γ RIIA, Fc γ RIIIA). Оценку связывающей активности цитокинового участка проводят, как правило, методом проточной цитометрии. Следует отметить, что определение (и сравнение) аффинности связывания антительного и цитокинового доменов с соответствующими лигандами может помочь выявить возможность нежелательного биораспределения ИЦ *in vivo* на раннем этапе.

Тест-системы на основе целевых монослойных и 3D-клеточных культур

Традиционные монослойные культуры, опухолевые и неопухолевые, остаются «золотым стандартом» клеточных тест-систем для оценки биологической активности цитокинового и антительного участков ИЦ по отдельности, поскольку отражают механизм действия исследуемого белка на уровне изменения фенотипа клеток-мишеней.

Монослойные культуры используют, чтобы оценить:

- прямую биологическую активность цитокина в отношении опухолевых и иммортализованных неопухолевых клеточных культур: подавление пролиферации (например, IFN- α), индукцию пролиферации (например, IL-2 с помощью клеточной линии CTLL-2), индукцию выработки других цитокинов (например, продукция IFN- γ при обработке NK-клеток IL-12), цитотоксичность (TNF), противовирусное действие (IFN- α), хемотаксис (хемотаксис), иммуномодулирующие свойства (активация макрофагов гранулоцитарным макрофагальным колониестимулирующим фактором). Примеры стандартных протоколов и общепринятых методов детекции результатов перечисленных воздействий — жизнеспособности клеток-мишеней, цитотоксичности — см. в обзоре A.R. Mire-Sluis и соавт. [24]. Помимо подтверж-

дения биологической активности, тест-системы на основе монослойных культур позволяют проводить отбор ИЦ с «суженной» активностью цитокина по значению полумаксимальной эффективной концентрации EC50 [25];

- блокирующую функцию антительного участка ИЦ на основе полноразмерного IgG. В этом случае Fc-зависимый апоптоз клеток-мишеней оценивают по активации каспазы-3 или каспазы-7, либо по экспозиции фосфатидилсерина на внешней клеточной мембране с помощью аннексина V либо его производных [26].

Как способ детекции цитотоксичности все большее распространение получает метод электрохимической импедансной спектроскопии (ЭИС), который позволяет осуществлять мониторинг концентрации клеток-мишеней, изменений в их морфологии (размер, форма), силы адгезии, цитолиза по изменению электрических свойств поверхности сенсора в дне каждой лунки специального планшета. Как следствие, метод ЭИС применим для оценки общей биологической активности ИЦ в отношении иммортализованных, первичных двумерных клеточных культур и совместных культур, а также некоторых 3D-клеточных культур [27, 28].

3D-культуры (см. ниже) неопухолевых клеток необходимы для оценки специфической биологической активности некоторых цитокинов. Так, для оценки такой функции IFN- α , как подавление ангиогенеза, эпителиальные клетки HUVEC выращивают на подложке Matrigel. Подавление пролиферации, миграции, инвазии и образования сосудов в результате воздействия ИЦ оценивают методом микроскопии (например, см. работу Z. Li и соавт. [29]).

Тест-системы на основе совместных клеточных культур

Эффекторные функции антительного участка в составе ИЦ оценивают на адгезионных совместных культурах с помощью того же ряда тестов, что используются для обычных антител: в общем случае клетки-мишени (как правило, опухолевые), экспрессирующие целевой антиген, инкубируются с эффекторными клетками и ИЦ. Детекцию жизнеспособности клеток-мишеней и цитотоксичности осуществляют как общепринятыми методами (см. в работе X.R. Jiang и соавт. [26]), так и с помощью ЭИС (например, работы K.E. Fenerty и соавт. [27], B. Xi и соавт. [28]).

В качестве источника эффекторных клеток при определении АЗКЦ могут использоваться NK, выделенные из мононуклеаров периферической крови; непосредственно мононуклеары периферической крови; линии NK с высокой экспрессией CD16a (Fc γ RIIIA), например линия NK92.CD16V. В случае комплементзависимой цитотоксичности используют

коммерческий либо полученный из донорской крови источник комплемента. При оценке АЗФ исследуемый ИЦ инкубируется с клетками-мишенями и цельной кровью либо с моноклеарами периферической крови, либо с выделенными из них эффекторными клетками, либо с линиями макрофагов (например, линией U937); в этих случаях клетки должны быть дифференцированы в одноядерные [26].

Результаты, полученные с использованием донорской крови и ее фракций как источника эффекторных клеток, с одной стороны, отражают механизмы действия Fc-домена антител на уровне изменения фенотипа клеток-мишеней и эффекторных клеток по таким оцениваемым параметрам, как, например, изменение уровня пролиферации, выброс проапоптотических факторов и пр. С другой стороны, донорская кровь вносит значимую вариабельность в результаты теста. Как альтернативный вариант, для оценки эффекторных функций антительного участка ИЦ возможно использование репортерных тест-систем (см. ниже).

Активацию NK Fc-фрагментом антительного участка ИЦ в ходе АЗКЦ оценивают, как правило, методом проточной цитометрии по увеличению экспрессии маркеров активации CD69, CD107a [26].

Совместные культуры опухолевых и эффекторных клеток используются для определения **полной биологической активности ИЦ** на основе антител с сохраненными эффекторными функциями, поскольку содержат мишени как для антительного, так и для цитокинового участков ИЦ. Полный биологический эффект ИЦ на основе антител с эффекторными функциями может быть результатом аддитивности и/или синергии эффектов всех отдельных заложенных в дизайне механизмов действия антительного и цитокинового участков. В общем случае в итоге совместного культивирования опухолевых и эффекторных клеток оценивают следующие параметры (табл. 1):

- цитотоксичность в отношении опухолевых клеток-мишеней;
- активацию эффекторных клеток;
- пролиферацию эффекторных клеток;
- профиль экспрессируемых в супернатант цитокинов/хемокинов.

В зависимости от ожидаемой функции цитокина на совместных культурах также проводят дополнительные тесты. Например, для ИЦ с IFN- α оценивают созревание дендритных клеток, активацию CD8⁺-Т-клеток за счет зрелых дендритных клеток [29].

Репортерные клеточные системы

Репортерные клеточные линии применяются для оценки связывающей активности различных белковых молекул. Использование таких систем основано на способности исследуемых белковых молекул

запускать внутриклеточные сигнальные каскады с участием транскрипционных факторов вследствие взаимодействия данных белковых молекул с рецептором на внешней мембране клетки.

Традиционно такие клеточные линии получают следующим способом. Репортерная экспрессионная конструкция, содержащая репортерный ген под контролем минимального промотора и сайта связывания для транскрипционного фактора, путем трансфекции вводится в клетку-хозяин и случайным образом встраивается в ее геном. В том случае, если взаимодействие клетки-хозяина с функциональной белковой молекулой приводит к активации транскрипционного фактора (срабатывает механизм действия данной белковой молекулы на уровне активации сигнальных путей), наблюдается экспрессия репортерного гена — как правило, флуоресцентного белка или фермента, — которая далее количественно оценивается.

Так, для оценки АЗФ антительного участка ИЦ возможно использование репортерной системы на основе Т-клеток Jurkat, экспрессирующих рецептор Fc γ RIIA и содержащих NFAT-зависимый промотор, направляющий транскрипцию гена люциферазы, активность которой далее измеряется. Аналогичные репортерные системы получены для оценки способности Fc-фрагмента антительного участка активировать NK, в этом случае модифицированная линия Т-клеток Jurkat экспрессирует на поверхностной мембране рецептор Fc γ RIIA [30].

Возможен вариант конструирования репортерных систем, когда репортерный ген находится под контролем эндогенного промотора, — более физиологически релевантный в плане сохранения клеточных сигнальных путей. В работе J. Liu и соавт. [31] описан вариант замены одного аллеля гена *IL-2* в клеточной линии Jurkat геном люциферазы светлячков с помощью технологии CRISPR-Cas9.

В настоящее время интерес вызывает создание универсальных репортерных систем, позволяющих определять биологическую активность потенциальных терапевтических иммуномодулирующих белков различных классов (цитокинов, хемокинов, агонистов толл-подобных рецепторов и др.), а также их конъюгатов с антителами и полимерами. Использование таких репортерных систем могло бы сократить количество времени и средств, требующихся для определения биологической активности отдельно взятого иммуномодулирующего белка, а также дать возможность сравнительной характеристики изучаемых иммуномодуляторов и их модифицированных вариантов, в частности ИЦ на основе одинаковых антительных участков с различными цитокиновыми участками.

Две люциферазные репортерные системы такого типа были разработаны группой исследователей

Таблица 1. Методы оценки биологической активности отдельных участков ИЦ и целого ИЦ в условиях *in vitro* на целевых и совместных культурах
Table 1. Methods for assessing the biological activity of individual sites of IC and the entire IC under *in vitro* conditions on target cultures and co-cultures

Функционально активная часть ИЦ Functionally active site of the IC	Целевая культура (монослойная/трехмерная) Target culture (monolayer/3D)		Совместная культура (адгезионная/суспензионная) Co-culture (adhesive/suspension)	
	Оцениваемый параметр Estimated parameter	Возможные методы детекции Possible detection methods	Оцениваемый параметр Estimated parameter	Возможные методы детекции Possible detection methods
Вариабельный домен Variable region	Блокировка рецептора Receptor blocking	Оценка жизнеспособности клеток-мишеней (общепринятые методы): • витальные красители; • тест на метаболическую активность (определение уровня внутриклеточного аденозинтрифосфата); • тест на выделение внутриклеточного белка (лактадегидрогеназы) Assessment of target cell viability (common methods): • vital dyes; • metabolic activity assay (adenosine triphosphate assay); • intracellular protein release assay (lactate dehydrogenase assay)	—	—
Fc-домен Fc-domain	—	—	Эффекторные функции: КЗЦ, АЗКЦ, АЗФ Effector functions: CDC, ADCC, ADCP	Детекция апоптоза клеток-мишеней; оценка жизнеспособности клеток-мишеней: • общепринятые методы; • метод ЭИС Detection of target cells apoptosis; target cell viability assessment: • generally accepted methods; • EIS method
Цитокин Cytokine	Прямая цитотоксичность Direct cytotoxicity	Оценка жизнеспособности клеток-мишеней; детекция апоптоза клеток-мишеней: • активация каспаз 3/7; • изменения мембраны; • метод ЭИС Assessment of target cells viability; detection of target cells apoptosis: • caspase 3/7 activation; • membrane changes; • EIS method	Активация NK NK activation	Определение экспрессии маркеров активации CD69, CD107a методом проточной цитометрии Determination of expression of activation markers CD69, CD107a by flow cytometry

Окончание табл. 1
End of table 1

Функционально активная часть ИЦ Functionally active site of the IC	Целевая культура (монослойная/трехмерная) Target culture (monolayer/3D)		Совместная культура (адгезионная/суспензионная) Co-culture (adhesive/suspension)	
	Оцениваемый параметр Estimated parameter	Возможные методы детекции Possible detection methods	Оцениваемый параметр Estimated parameter	Возможные методы детекции Possible detection methods
Цитокин Cytokine	Индукция экспрессии МНС I и II типа Induction of MHC type I and II expression	Определение экспрессии МНС I и II типа методом проточной цитометрии Determination of MHC type I and II expression by flow cytometry	—	—
	Индукция выработки других цитокинов Induction of other cytokines	Определение профиля вырабатываемых цитокинов методом мультиплексного ИФА Determination of the produced cytokines profile by multiplex ELISA		
	Индукция активации и пролиферации эффекторных клеток Induction of effector cells activation and proliferation	Определение экспрессии маркеров активации, пролиферации методом проточной цитометрии Determination of the activation and proliferation markers expression by flow cytometry		
	Подавление ангиогенеза (интерферон α , трехмерная культура): подавление пролиферации, миграции, инвазии и образования сосудов Inhibition of angiogenesis (interferon α , 3D culture): inhibition of proliferation, migration, invasion and vascularization	Мониторинг миграции и состояния клеточ-мишеней (трехмерная культура) методом микроскопии Monitoring of migration and target cells state (3D culture) by microscopy		
Целый ИЦ Entire IC	—	—	Полная биологическая активность: элиминация клеточ-мишеней, индукция пролиферации и активации эффекторных клеток Complete biological activity: elimination of target cells, induction of effector cells proliferation and activation	См. методы детекции для оценки биологической активности Fe-домена и цитокина на целевых и совместных культурах See detection methods for assessing the biological activity of Fe-domain and cytokine on target cultures and co-cultures

Примечание. ИЦ — иммуноцитотоксин; КЗЦ — комплементзависимая цитотоксичность; АЗКЦ — антителозависимая цитотоксичность; АЗФ — антителозависимый фагоцитоз; ЭИС — электрохимическая импедансная спектроскопия; МНС — молекула главного комплекса гистосовместимости; ИФА — иммуноферментный анализ.
Note. IC — immunocytotoxic; CDC — complement-dependent cytotoxicity; ADCC — antibody-dependent cell cytotoxicity; ADCP — antibody-dependent cellular phagocytosis; EIS — electrochemical impedance spectroscopy; MHC — major histocompatibility complex molecule; ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay.

под руководством D. Neri [32] на основе культур мышечных Т- и В-клеток (линии CTTL-2 и A20 соответственно), в которых репортерный ген люциферазы находится под контролем NF- κ B-RE-элемента. При разработке данных репортерных систем авторы исходили из факта, что многие сигнальные пути, активируемые цитокинами, напрямую либо косвенно приводят к активации NF- κ B; как следствие, полученная репортерная система на основе иммунных клеток, экспрессирующих на поверхности ряд иммунологически важных рецепторов, потенциально позволяет количественно характеризовать различные иммуномодуляторы. Полученные с помощью новых репортерных систем данные о биологической активности цитокиновых участков нескольких ИЦ, разработанных ранее группой под руководством D. Neri (L19-IL-2, F8-TNF, L19-IL-12), оказались сравнимыми с данными, полученными с помощью традиционных монослойных клеточных культур. Помимо этого, разработанные репортерные системы позволили авторам обнаружить новую стратегию потенцирования действия цитокинов — за счет антителозависимого образования кластеров из мультимерных цитокинов (в рассматриваемом случае — членов суперсемейства TNF) на компонентах опухолеассоциированного внеклеточного матрикса.

Репортерные тест-системы отражают механизм действия исследуемого белка на уровне активации сигнальных путей и позволяют исключить вариативность в результатах, обусловленную изменчивостью природного источника эффекторных клеток — донорской крови и ее фракций, а также снизить затраты времени и труда на проведение самого анализа [30]. Несмотря на данные преимущества, в настоящий момент большая часть исследований осуществляется на стандартных линиях или клетках, выделенных из крови доноров, однако репортерные тест-системы могут заменить данные стандартные подходы в будущем.

Тест-системы на основе 3D-моделей опухолей

Как было указано выше, ИЦ являются мультифункциональными молекулами, в полный биологический эффект которых могут вносить вклад эффекты всех отдельных механизмов действия антительного и цитокинового участков. Для адекватной характеристики в условиях *in vitro* таких молекул клеточная тест-система должна воспроизводить сложное микроокружение и свойства опухоли человека и содержать мишени для антительного и цитокинового участков ИЦ.

Таким требованиям отвечают 3D-модели опухолей [33]. Так, они способны воспроизвести 3D-культуру гетерогенных опухолевых клеток в сложном микро-

окружении из клеточных (фибробласты, эндотелиальные, иммунные и другие типы клеток) и неклеточных (различные сигнальные молекулы, секретируемые клетками опухоли и ее микроокружения: факторы роста, цитокины, хемокины и др.) компонентов, внеклеточного матрикса (совокупность фибронектинов, коллагена, протеогликанов, гликопротеинов и др.).

Помимо этого, 3D-модели опухолей на основе микрофлюидных устройств способны достаточно точно воссоздавать состояние перфузии и сопутствующие механические напряжения, присутствующие в тканях, в зависимости от типа моделируемого рака. В случае сложных систем по типу «тело-на-чипе», «орган-с-опухолью-на-чипе» [34, 35] возможны исследования фармакокинетики, фармакодинамики и безопасности кандидатных противоопухолевых препаратов, в частности ИЦ с сохраненной связывающей активностью FcRn.

Типы 3D-моделей опухолей и способы их получения подробно описаны ранее [33]. Следует отметить, что 3D-клеточные культуры имеют большой потенциал заменить монослойные культуры в качестве платформы для скрининга потенциальных противоопухолевых соединений, в том числе ИЦ. На данный момент существуют коммерческие предложения реактивов, расходных материалов для получения и работы с 3D-клеточными культурами. Также доступны протоколы, методы для работы с 3D-культурами и образовательные материалы.

Далее будут рассмотрены некоторые примеры использования 3D-моделей опухолей для изучения биологической активности ИЦ (методы из указанных исследований представлены в табл. 2) и доступные результаты их клинических исследований.

S. Herter и соавт. разработали гетеротипическую сфероидную модель на основе клеток аденокарциномы кишечника и фибробластов [36]. Авторы использовали ИЦ формата IgG-IL-2v, таргетированные к раково-эмбриональному антигену CEA и фибробластактивирующему белку FAP: анти-CEA-IL-2v и анти-FAP-IL-2v [15, 16], а также биспецифические антитела анти-CD3 ϵ –анти-CEA и анти-CD3 ϵ –анти-FAP. В качестве источника иммунных клеток использовали мононуклеары периферической крови доноров. В работе исследовали таргетирование ИЦ и биспецифических антител к соответствующим областям гетеросфероидов, а также инфильтрацию, активацию и цитотоксичность иммунных клеток в ответ на указанные иммунотерапевтические препараты.

Были показаны специфичное связывание ИЦ анти-CEA-IL-2v и анти-FAP-IL-2v с опухолевыми клетками и фибробластами в гетеросфероиде соответственно, инфильтрация иммунных клеток в гетеросфероид и избирательное элиминирование

Таблица 2. Методы оценки биологической активности отдельных участков ИЦ и целого ИЦ в условиях in vitro на трехмерных моделях опухолей
Table 2. Methods for assessing the biological activity of individual sites of IC and the entire IC in vitro on 3D tumor models

Функционально активная часть ИЦ Functionally active site of the IC	Оцениваемый параметр Estimated parameter	Возможные методы детекции Possible detection methods
Вариабельный домен Variable domain	Таргетирование ИЦ к опухолевым клеткам Targeting IC to tumor cells	- Мониторинг миграции флуоресцентно меченного ИЦ и его взаимодействия с клетками-мишенями и эффекторными клетками методом оптической микроскопии (микрофлюидная модель, сфероиды); - иммуногистохимический анализ миграции флуоресцентно меченного ИЦ (сфероиды) - Monitoring of the fluorescently labeled IC migration and its interaction with target cells and effector cells by optical microscopy (microfluidic model, spheroids); - immunohistochemical analysis of the fluorescently labeled IC migration (spheroids)
	Элиминация опухолевых клеток Elimination of tumor cells	Анализ жизнеспособности сфероидов с помощью колориметрических тестов и оптической микроскопии Viability analysis of spheroids using colorimetric tests and optical microscopy
	Миграция эффекторных клеток к опухолевым клеткам (NK, NKT, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ -Т-клеток) Migration of effector cells to tumor cells (NK, NKT, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T cells)	- Мониторинг миграции флуоресцентно меченных эффекторных клеток (определенного типа) и их взаимодействия со сфероиды методом микроскопии (микрофлюидная модель, сфероиды); - иммуногистохимический анализ миграции эффекторных клеток (сфероиды) - Monitoring of fluorescently labeled effector cells migration (certain type) and their interaction with spheroids by microscopy (microfluidic model, spheroids); - immunohistochemical analysis of effector cell migration (spheroids)
Вариабельный домен, Fc-домен, цитокин Variable domain, Fc domain, cytokine	Активация и пролиферация эффекторных клеток (NK, NKT, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ -Т-клеток) Activation and proliferation of effector cells (NK, NKT, CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T cells)	- Оценка пролиферации флуоресцентно меченных эффекторных клеток (определенного типа) методом проточной цитометрии; - оценка активации эффекторных клеток (определенного типа) методом проточной цитометрии по маркерам активации - Assessment of the fluorescently labeled effector cells proliferation (certain type) by flow cytometry; - assessment of the activation of effector cells (certain type) by flow cytometry using activation markers
	Секретция цитокинов/хемокинов Cytokines/chemokines Secretion	- Определение профиля вырабатываемых цитокинов и хемокинов методом мультиплексной проточной цитометрии; - определение профиля вырабатываемых цитокинов и хемокинов методом мультиплексного ИФА; - определение профиля экспрессии генов цитокинов, хемокинов, хемокиновых рецепторов методом ПЦР в реальном времени - Determination of the produced cytokines and chemokines profile by the method of multiplex flow cytometry; - Determination of the produced cytokines and chemokines profile by multiplex ELISA; - determination of the gene expression profile of cytokines, chemokines, chemokine receptors by real-time PCR

Примечание. ИЦ – иммуноцитотоксин; ИФА – иммуноферментный анализ; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Note. IC – immunocytocine; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; PCR – polymerase chain reaction.

соответствующими ИЦ IgG-IL-2v и биспецифическими антителами опухолевых клеток и фибробластов вследствие активации иммунных клеток (Т-, NK-, NKT-клеток). В целом повышенная инфильтрация иммунных клеток в гетеросфероид, их активация, секреция цитокинов и более быстрое элиминирование клеток-мишеней наблюдались при комбинированном использовании IgG-IL-2v и биспецифических антител.

Иммуноцитокينات анти-CEA-IL-2v и анти-FAP-IL-2v лишены эффекторных функций антительного участка (кроме связывания с FcRn) и имеют повышенную аффинность к соответствующим антигенам. Также IL-2v селективно связывается с гетеродимерным среднеаффинным рецептором IL-2R $\beta\gamma$ и не способен связываться с CD25 на регуляторных Т-клетках. Данная модификация направлена на снижение токсичности IL-2.

В I фазе клинических исследований анти-FAP-IL-2v показал умеренную токсичность, способность активировать NK и CD8⁺-Т-клетки в периферической крови, а также проявил терапевтическую активность в виде монотерапии [37], что согласуется с результатами эффективности анти-FAP-IL-2v, полученными на модели опухолевых сфероидов.

Анти-CEA-IL-2v показал высокую противоопухолевую эффективность в доклинических исследованиях, однако во II фазе клинических исследований не проявил достаточную терапевтическую эффективность в виде монотерапии и в комбинации с ингибиторами контрольных точек иммунитета. Его клинические исследования были прекращены по решению спонсора [15].

J.M. Ayuso и соавт. разработали микрофлюидную модель по типу «орган-на-чипе» [38] для изучения иммунотерапевтических препаратов, направленных на активацию и рекрутирование NK-клеток к опухоли и последующую АЗКЦ.

В данной работе клетки рака молочной железы (MCF-7) выращивали в виде сфероидов и помещали в коллагеновый гидрогель. Фланкирующие латеральные полости заселяли эндотелиальными клетками, далее через них пропускали культуральную среду для имитации кровеносных сосудов. NK отдельно либо совместно с ИЦ на основе полноразмерного антитела на основе IL-2, таргетированного к молекуле клеточной адгезии ЕpCAM (анти-ЕpCAM-IL-2), включали в модель, чтобы изучить миграцию NK (в том числе через полученный барьер из эндотелиальных клеток), их цитотоксичность, в случае использования ИЦ – АЗКЦ в 3D-пространстве.

По наблюдениям авторов, проникновению ИЦ в сфероид препятствовали межклеточные контакты, кроме того, опухолевые клетки оказались способны захватывать ИЦ посредством эндоцитоза во внутри-

клеточные липидные везикулы. В то время как клетки NK-92 мигрировали к сфероиду по градиенту хемокинов и проникали в опухоль в течение нескольких часов, АЗКЦ ИЦ не распространялась далее поверхностного слоя сфероида, возможно, из-за ограниченного проникновения ИЦ анти-ЕpCAM-IL-2 в опухоль.

Анти-ЕpCAM-IL-2 является ИЦ на основе IL-2 дикого типа с той же аффинностью к ЕpCAM, что и у исходного антитела. По результатам II фазы клинических исследований анти-ЕpCAM-IL-2 в комбинации с циклофосфамидом [39] проявлял умеренную токсичность, но не показал преимуществ в терапевтическом действии по сравнению с контрольной группой. Возможно, причина недостаточной эффективности анти-ЕpCAM-IL-2 заключалась в его неспособности пройти через межклеточные контакты в опухоль, что стало возможным наблюдать с помощью 3D-модели опухоли.

A. Jaekel и соавт. использовали совместную культуру сфероидов рака молочной железы MCF-7 и одноклеточных клеток периферической крови для оценки способности к инфильтрации нового ИЦ на основе IL-15 и полноразмерного антитела к опухолеассоциированному гликозилированному эпигену MUC1 [40]. Было показано, что ИЦ GT-00A x IL15, в противоположность исходному антителу GT-00A, индуцирует инфильтрацию CD8⁺-Т-клеток внутрь сфероидов, а также способствует уменьшению размера сфероидов.

По результатам доклинических исследований на нескольких мышинных моделях GT-00A x IL15 показал эффективность в качестве монотерапии.

Заключение

В настоящем обзоре были рассмотрены существующие подходы к характеристике биологической активности ИЦ в условиях *in vitro* в ходе доклинических исследований.

Выбор методов для оценки биологической активности ИЦ в условиях *in vitro* будет определяться используемыми в дизайне функциями антительного и цитокинового участков.

- Для подтверждения используемого в дизайне ИЦ механизма действия его отдельных участков достаточно работы с монослойными культурами.
- Несмотря на время- и трудозатратность, тест-системы «золотого стандарта» для определения специфической биологической активности цитокина(ов) и эффекторных функций антительного участка используются в подавляющем большинстве исследований новых вариантов ИЦ.
- Коммерческие репортерные клеточные системы остаются альтернативным вариантом оценки заложенной в дизайне биологической активности

цитокинового и антительного участков на уровне активации сигнальных путей. В настоящее время представляют интерес и разрабатываются «универсальные» репортерные системы, позволяющие количественно охарактеризовать ИЦ с различными цитокиновыми участками и их вариантами на одной репортерной клеточной линии.

- Совместные культуры опухолевых и эффекторных клеток позволяют оценить цитотоксический и иммуномодулирующий эффекты антительного и цитокинового участков без использования методов 3D-культивирования.
- Использование 3D-моделей опухолей позволяет заменить несколько тестов на биологическую активность отдельных участков ИЦ, проводимых на монокультурах и совместных культурах, на одно комплексное исследование. Это дает возможность оценить противоопухолевую активность ИЦ в условиях, более приближенных к реальным: его способность проникать в ткани и элиминировать опухолевые клетки за счет цитотоксичности и активации иммунных клеток. Недостатком такого подхода являются значительные временные и материальные затраты.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Berraondo P., Sanmamed M.F., Ochoa M.C. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br J Cancer* 2019;120(1):6–15. DOI: 10.1038/s41416-018-0328-y
- Conlon K.C., Miljkovic M.D., Waldmann T.A. Cytokines in the treatment of cancer. *J Interferon Cytokine Res* 2019;39(1):6–21. DOI: 10.1089/jir.2018.0019
- Hutmacher C., Neri D. Antibody-cytokine fusion proteins: biopharmaceuticals with immunomodulatory properties for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2019;141:67–91. DOI: 10.1016/j.addr.2018.09.002
- Collins S., Joshi A., Shen L. et al. 357 TAK-573, an anti-CD38-attenuated interferon alpha (IFN α) fusion protein (AttenukineTM), has demonstrated IFN α receptor (IFNAR) pathway modulation in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *J Immunother Cancer* 2020;8:Suppl 3. DOI: 10.1136/jitc-2020-SITC2020.0357
- Runbeck E., Crescioli S., Karagiannis S.N., Papa S. Utilizing immunocytokines for cancer therapy. *Antibodies (Basel)* 2021;10(1):10. DOI: 10.3390/antib10010010
- Kaufman H.L., Mehnert J.M., Cuillerot J.-M. et al. Targeted modified IL-2 (NHS-IL2, MSB0010445) combined with stereotactic body radiation in advanced melanoma patients after progression on ipilimumab: assessment of safety, clinical, and biologic activity in a phase 2a study. *J Clin Oncol* 2014;32(15 suppl):TPS9107. DOI: 10.1200/jco.2014.32.15_suppl.tps9107
- Overgaard N.H., Fan T.M., Schachtschneider K.M. et al. Of mice, dogs, pigs, and men: choosing the appropriate model for immuno-oncology research. *ILAR J* 2018;59(3):247–62. DOI: 10.1093/ilar/ily014
- Neri D. Antibody-cytokine fusions: versatile products for the modulation of anticancer immunity. *Cancer Immunol Res* 2019;7(3):348–54. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0622
- Young P.A., Morrison S.L., Timmerman J.M. Antibody-cytokine fusion proteins for treatment of cancer: engineering cytokines for improved efficacy and safety. *Semin Oncol* 2014;41(5):623–36. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2014.08.002
- Gillies S.D., Lan Y., Lo K.M. et al. Improving the efficacy of antibody-interleukin 2 fusion proteins by reducing their interaction with Fc receptors. *Cancer Res* 1999;59(9):2159–66.
- Wahab S., Hussain A. Cytokines as targets for immunomodulation. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013;5:60–4.
- Zou G.M., Tam Y.K. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw* 2002;13(2):186–99.
- Gillies S.D., Lan Y., Hettmann T. et al. A low-toxicity IL-2-based immunocytokine retains antitumor activity despite its high degree of IL-2 receptor selectivity. *Clin Cancer Res* 2011;17(11):3673–85. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2921
- Pogue S.L., Taura T., Bi M. et al. Targeting attenuated interferon- α to myeloma cells with a CD38 antibody induces potent tumor regression with reduced off-target activity. *PLoS ONE* 2016;11(9):e0162472. DOI: 10.1371/journal.pone.0162472
- Klein C., Waldhauer I., Nicolini V.G. et al. Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. *Oncimmunology* 2017;6(3):e1277306 DOI: 10.1080/2162402x.2016.1277306
- Klein C., Inja W., Nicolini V. et al. Abstract PR8: Novel tumor-targeted, engineered IL-2 variant (IL-2v)-based immunocytokines for immunotherapy of cancer. *Cancer Res* 2013;73:PR8.
- Hemmerle T., Neri D. The dose-dependent tumor targeting of antibody-IFN γ fusion proteins reveals an unexpected receptor-trapping mechanism *in vivo*. *Cancer Immunol Res* 2014;2(6):559–67. DOI: 10.1158/2326-6066.cir-13-0182
- Kaspar M., Trachsel E., Neri D. The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2007;67(10):4940–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0283
- Tzeng A., Kwan B.H., Opel C.F. et al. Antigen specificity can be irrelevant to immunocytokine efficacy and biodistribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112(11):3320–5. DOI: 10.1073/pnas.1416159112
- Gillies S.D. A new platform for constructing antibody-cytokine fusion proteins (immunocytokines) with improved biological properties and adaptable cytokine activity. *Protein Eng Des Sel* 2013;26(10):561–9. DOI: 10.1093/protein/gzt045
- Mock J., Stringhini M., Villa A. et al. An engineered 4-1BBL fusion protein with “activity on demand”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117(50):31780–8. DOI: 10.1073/pnas.2013615117
- Venet D., Koovely D., Weder B., Neri D. Targeted reconstitution of cytokine activity upon antigen binding using split cytokine antibody fusion proteins. *J Biol Chem* 2016;291(35):18139–47. DOI: 10.1074/jbc.M116.737734
- Кособокова Е.Н., Шешукова Е.В., Пинюгина М.В. и др. Разработка технологии получения слитного белка на основе моноклонального гуманизированного антитела против опухолевого антигена HER2 и интерферона- α -2b человека из *Nicotiana benthamiana*. *Биотехнология* 2019;35(2):49–57. DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-49-57
- Kosobokova E.N., Sheshukova E.V., Pinyugina M.V. et al.

- Development of technology for producing of fusion protein based on humanized monoclonal antibody to tumor HER2 antigen and recombinant human interferon- α -2b in *Nicotiana benthamiana*. *Biotechnologiya = Biotechnology* 2019;35(2):49–57. (In Russ.). DOI: 10.21519/0234-2758-2019-35-2-49-57
24. Mire-Sluis A.R., Page L., Thorpe R. Quantitative cell line based bioassays for human cytokines. *J Immunol Methods* 1995;187(2):191–9. DOI: 10.1016/0022-1759(95)00220-1
 25. Dakhel S., Lizak C., Matasci M. et al. An attenuated targeted-TNF localizes to tumors *in vivo* and regains activity at the site of disease. *Int J Mol Sci* 2021;22(18):10020. DOI: 10.3390/ijms221810020
 26. Jiang X.R., Song A., Bergelson S. et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10(2):101–10. DOI: 10.1038/nrd3365
 27. Fenerty K.E., Padgett M., Wolfson B. et al. Immunotherapy utilizing the combination of natural killer- and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)-mediating agents with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition. *J Immunother Cancer* 2018;6(1): 133. DOI: 10.1186/s40425-018-0445-4
 28. Xi B., Ye P.F., Golubovskaya V., Abassi Y. *In vitro* functional assay using real-time cell analysis for assessing cancer immunotherapeutic agents. In: *Immuno-oncology. Cellular and translational approaches*. Ed. by S.L. Tan. Humana, N.Y., 2020. P. 35–50. DOI: 10.1007/978-1-0716-0171-6_3
 29. Li Z., Zhu Y., Li C. et al. Anti-VEGFR2-interferon- α 2 regulates the tumor microenvironment and exhibits potent antitumor efficacy against colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2017;6(3):e1290038. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1290038
 30. Wang L., Yu C., Wang J. Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuticals. *Biotechnol Adv* 2020;39:107466. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.107466
 31. Liu J., Liu R., Gray P. et al. Development of a luciferase reporter Jurkat cell line under the control of endogenous interleukin-2 promoter. *J Immunol Methods* 2017;451:48–53. DOI: 10.1016/j.jim.2017.08.006
 32. Mock J., Pellegrino C., Neri D. A universal reporter cell line for bioactivity evaluation of engineered cytokine products. *Sci Rep* 2020;10(1):3234. DOI: 10.1038/s41598-020-60182-4
 33. Brancato V., Oliveira J.M., Corrello V.M. et al. Could 3D models of cancer enhance drug screening? *Biomaterials* 2020;232:119744. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119744
 34. Bregenzer M.E., Horst E.N., Mehta P. et al. Integrated cancer tissue engineering models for precision medicine. *PLoS ONE* 2019;14(5):e0216564. DOI: 10.1371/journal.pone.0216564
 35. Dhiman N., Kingshott P., Sumer H. et al. On-chip anticancer drug screening – recent progress in microfluidic platforms to address challenges in chemotherapy. *Biosens Bioelectron* 2019;137:236–54. DOI: 10.1016/j.bios.2019.02.070
 36. Herter S., Morra L., Schlenker R. et al. A novel three-dimensional heterotypic spheroid model for the assessment of the activity of cancer immunotherapy agents. *Cancer Immunol Immunother* 2017;66(1):129–40. DOI: 10.1007/s00262-016-1927-1
 37. Soerensen M.M., Ros W., Rodriguez-Ruiz M.E. et al. Safety, PK/PD, and anti-tumor activity of RO6874281, an engineered variant of interleukin-2 (IL-2v) targeted to tumor-associated fibroblasts via binding to fibroblast activation protein (FAP). *J Clin Oncol* 2018;36(15 suppl):e15155. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e15155
 38. Ayuso J.M., Truttschel R., Gong M.M. et al. Evaluating natural killer cell cytotoxicity against solid tumors using a microfluidic model. *Oncoimmunology* 2019;8(3):1553477. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1553477
 39. Gladkov O., Biakhov M., Ramlau R. et al. Phase II trial of huKS-IL2 with cyclophosphamide (CTX) in patients with extensive disease small-cell lung cancer (ED-SCLC). *J Clin Oncol* 2012;30(15 Suppl):7090. DOI: 10.1200/jco.2012.30.15_suppl.7090
 40. Jaekel A., Kehler P., Lischke T. et al. Preclinical characterization of GT-00A x IL15: a novel IL-15-based immunocytokine with unique tumor targeting properties. *J Immunother Cancer* 2021;9(Suppl 2):A741. DOI: 10.1136/jitc-2021-SITC2021.712

Вклад авторов

К.М. Коноплина: сбор и анализ данных литературы, написание текста статьи;
Е.Н. Кособокова: сбор и анализ данных литературы, разработка дизайна обзора;
В.С. Косоруков: экспертный анализ текста.

Authors contributions

K.M. Konoplina: collection and analysis of literature data, article written;
E.N. Kosobokova: collection and analysis of literature data, design of the review;
V.S. Kosorukov: final expertise of the article text.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.М. Коноплина / K.M. Konoplina: <https://orcid.org/0000-0003-0130-2628>
Е.Н. Кособокова / E.N. Kosobokova: <https://orcid.org/0000-0002-4660-8519>
В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1060.

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, agreement № 075-15-2021-1060.

Статья поступила: 25.04.2022. Принята к публикации: 31.08.2022.

Article submitted: 25.04.2022. Accepted for publication: 31.08.2022.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-3-23-33>

Линейные мыши СВА как модель спонтанного канцерогенеза

О.А. Бочарова¹, Р.В. Карпова¹, Е.В. Бочаров¹, А.А. Аксенов¹, В.Г. Кучеряну², А.В. Ревущин³,
Г.В. Павлова³, Н.Е. Кушлинский¹

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

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

³ФГБНУ «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН»; Россия, 117485 Москва, ул. Бутлерова, 5А

Контакты: Ольга Алексеевна Бочарова imufarm@rambler.ru

В обзоре проанализированы некоторые параметры самцов мышей линии СВА как модели спонтанного канцерогенеза, характеризующие адгезивные и адаптивные нарушения. Ослабление силы взаимной адгезивности гепатоцитов отмечалось у самцов мышей СВА уже в раннем онтогенезе (5–10-й дни постнатального развития). Это нарушение сохранялось и усиливалось при гепатоканцерогенезе. В онтогенезе у самцов мышей данной линии происходит снижение экспрессии β 2-лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови, а также повышение уровня интерлейкинов 6 и 10 в сыворотке крови. Это имеет значение для ослабления контактных взаимодействий клеток печени (взаимная адгезивность), а также взаимодействия эффекторов иммунитета и опухолевых клеток. Обнаружено, что с возрастом у самцов мышей СВА возникает дисбаланс важных компонентов адаптационных реакций и качества жизни; количество дофаминергических нейронов и уровень нейрогенеза снижаются. Это не противоречит динамике показателей хронического стресса и процесса старения: повышение уровня катаболического стресс-гормона кортикостерона, снижение уровня анаболического гормона тестостерона в сыворотке крови, ослабление двигательной активности, признаки кахексии и алопеции, а также нарушение иммунологических показателей.

Самцы мышей СВА при оценке параметров, характеризующих адгезивно-адаптационные нарушения при спонтанном канцерогенезе (сила взаимной адгезивности гепатоцитов, экспрессия β 2-лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови, содержание интерлейкинов 6, 10, кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови, количество дофаминергических нейронов в среднем мозге в онтогенезе), а также частоту и размеры опухолей, продолжительность жизни и соматический статус животных, могут применяться в качестве научно обоснованной и доказательной тест-системы для изучения цитостатических препаратов, а также нетоксичных геропротекторов для профилактики и лечения рака у лиц с повышенным риском развития злокачественных новообразований, особенно гепатоцеллюлярной карциномы.

Ключевые слова: самцы мышей СВА, β 2-лейкоцитарные интегрины LFA-1, Mac-1, интерлейкины 6, 10, кортизол, тестостерон, дофаминергические нейроны, гепатоканцерогенез

Для цитирования: Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Линейные мыши СВА как модель спонтанного канцерогенеза. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):23–33. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-23-33

CBA strain mice as a model of spontaneous carcinogenesis

Olga A. Bocharova¹, Regina V. Karpova¹, Evgeniy V. Bocharov¹, Andrey A. Aksyonov¹, Valerian G. Kucheryanu²,
Alexander V. Revishchin³, Galina V. Pavlova³, Nikolay E. Kushlinsky¹

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

²Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia;

³Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS; 5A Butlerova St., Moscow, 117485, Russia

Contacts: Olga Alekseevna Bocharova imufarm@rambler.ru

The review analyzes some parameters of CBA mice-males as model of spontaneous carcinogenesis characterizing adhesive and adaptive disorders. A weakening of the hepatocytes mutual adhesiveness force was noted already in early ontogenesis (5–10 days of postnatal development). This violation persisted and enhanced during hepatocarcinogenesis. A decrease of the $\beta 2$ leukocyte integrins LFA-1 and Mac-1 expression on peripheral blood cells as well as an increase of the interleukins 6 and 10 in blood serum were determined during ontogenesis. It is significant for weakening the liver cells contact interactions (mutual adhesiveness) as well as immunity effectors and tumor cells interactions. A disbalance of the adaptive reactions and life quality important components was revealed in the CBA mice-males ontogenesis. Number of dopaminergic neurons and the neurogenesis level in CBA mice-males were decreasing. This does not contradict the dynamics of chronic stress and the aging process: an increase in the catabolic stress hormone corticosterone, a decrease in the anabolic hormone testosterone in the blood serum, a decrease in motor activity, signs of cachexia and alopecia, as well as a violation of immunological parameters. CBA mice-males with an assessment of parameters characterizing adhesive and adaptive disorders during spontaneous carcinogenesis (the hepatocytes mutual adhesiveness force, the expression of $\beta 2$ leukocyte integrins LFA-1 and Mac-1 on peripheral blood cells, the content of interleukins 6, 10, corticosterone and testosterone in blood serum, the number of dopaminergic neurons in the midbrain during ontogenesis) as well as the frequency and size of tumours, lifespan and somatic status of animals can be used as a scientifically- and evidence-based test system to study cytostatic drugs as well as non-toxic geroprotective medications for prevention and treatment of cancer in individuals with an increased risk of malignant neoplasms developing especially hepatocellular carcinoma.

Keywords: CBA male mice, LFA-1, Mac-1, $\beta 2$ leukocyte integrins, interleukins 6, 10, cortisol, testosterone, dopaminergic neurons, hepatocarcinogenesis

For citation: Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. CBA strain mice as a model of spontaneous carcinogenesis. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(3):23–33. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-23-33

Введение

Инбредные линии мышей широко используются в биомедицинских исследованиях как для моделирования различных патологических состояний, так и для поиска профилактических и терапевтических воздействий [1, 2].

Мыши линии CBA являются моделью спонтанного канцерогенеза с высоким риском возникновения гепатокарцином. Эта линия была получена Леонелом С. Стронгом в конце 30-х годов XX в. путем скрещивания мышей *Bagg albino C* с мышами линии DBA [3]. У мышей CBA опухоли печени начинают возникать с 6 мес. Самцы более чувствительны к спонтанному и индуцированному канцерогенезу, в 18-месячном возрасте у них выявляют опухоли, по данным разных авторов, в 70–100 % случаев [4–7]. Вместе с тем эта модель максимально приближена к ситуации в клинической онкологии, когда опухоли возникают в том числе как результат наследственной предрасположенности.

Цель работы — проанализировать параметры самцов мышей CBA как модели спонтанного канцерогенеза, характеризующие адгезионные и адаптационные нарушения, и определить перспективы применения тест-системы с использованием самцов мышей CBA с научно обоснованными характеристиками для изучения *in vivo* препаратов-цитостатиков, а также нетоксичных препаратов-геропротекторов для профилактики и лечения онкозаболеваний у лиц с повышенным риском развития злокачественных новообразований, особенно гепатоцеллюлярной карциномы.

Исследования были проведены на самцах мышей линии CBA из питомника лабораторных животных «Столовая». Животных содержали в стандартных условиях вивария ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (12-часовой световой день, температура воздуха 22–26 °C, относительная влажность воздуха 40–75 %, стандартный рацион питания).

Ослабление взаимной адгезивности гепатоцитов в онтогенезе у самцов мышей высокоракетной линии CBA

Канадский ученый Дейл Коман впервые показал значительное снижение сил межклеточного сцепления в эпителиальных опухолях (рак губы, рак шейки матки) по сравнению с гомологичными нормальными тканями [8, 9].

В серии последующих наших работ были исследованы свойства межклеточных контактов гепатоцитов у самцов мышей с высокой (C57Bl) и низкой (CBA) устойчивостью к гепатоканцерогенезу. В качестве характеристики, отражающей прочность межклеточных контактов, использовали силу взаимной адгезивности гепатоцитов (F), выраженную в мг/клетку (кл). F определяли с помощью микроманипулятора Фонбрюна по модифицированному методу Комана [10].

В табл. 1 приведены значения F у самцов мышей CBA и C57Bl в онтогенезе.

Установлено, что ткань печени мышей как C57Bl, так и CBA на поздней стадии пренатального и в 1-й день

Таблица 1. Сила взаимной адгезивности гепатоцитов у самцов мышей СВА и С57В1 в онтогенезе ($M \pm SEM$)Table 1. The hepatocytes mutual adhesiveness force of CBA and C57Bl male mice in ontogenesis ($M \pm SEM$)

Показатель Indicator	Сила взаимной адгезивности гепатоцитов, мг/кл The hepatocytes mutual adhesiveness force, mg/cell	
	Мыши СВА CBA mice	Мыши С57В1 C57Bl mice
Возраст мышей: Age of mice:		
16–19-й день пренатального развития 16–19 th days of prenatal development	0,059 $\pm$ 0,001	0,059 $\pm$ 0,002
1-й день постнатального онтогенеза 1 st day of postnatal ontogenesis	0,059 $\pm$ 0,002	0,059 $\pm$ 0,002*
5-й и 10-й дни постнатального онтогенеза 5 th and 10 th days of postnatal ontogenesis	0,059 $\pm$ 0,002	0,141 $\pm$ 0,004*
1–2 мес 1–2 months	0,056 $\pm$ 0,003	0,160 $\pm$ 0,004*
5–7 мес 5–7 months	0,041 $\pm$ 0,002	0,123 $\pm$ 0,003*
8–9 мес 8–9 months	0,036 $\pm$ 0,006	0,121 $\pm$ 0,002*
10 мес 10 months	0,031 $\pm$ 0,006	0,120 $\pm$ 0,003*
12–13 мес 12–13 months	0,024 $\pm$ 0,003	0,118 $\pm$ 0,005*
15–24 мес 15–24 months	0,016 $\pm$ 0,001	0,112 $\pm$ 0,002
Опухоль Tumour	0,012 $\pm$ 0,005	—
Доля печени без опухоли («носитель») Liver lobe without tumour («carrier»)	0,015 $\pm$ 0,003	—

* $p < 0,001$.

постнатального развития имеет одинаково низкие показатели F ($0,059 \pm 0,002$ мг/кл). В устойчивой ткани у мышей С57В1 в период с 5-го по 10-й день постнатального развития происходит резкое увеличение F , практически в 3 раза (до $0,141 \pm 0,002$ мг/кл). Ослабление прочности межклеточных контактов наблюдается только у старых животных (в возрасте 15–24 мес) – до $0,112 \pm 0,002$ мг/кл [10–11].

У мышей СВА не происходит подобного резкого подъема F в раннем постнатальном онтогенезе. Вместе тем не наблюдается и уменьшения стволовых кроветворных клеток и снижения функции крове-творения, как у мышей С57В1. Более того, F у самцов СВА снижается от $0,059 \pm 0,002$ мг/кл (1-й день постнатального онтогенеза) до $0,016 \pm 0,001$ мг/кл (15–24-й месяц жизни). В результате на всем протяжении постнатального онтогенеза в печени самцов мышей СВА F в 3–5 раз ниже, чем у мышей С57В1. В опухоли, а также в доле печени, лишенной опухолевых узлов («носитель»), F не отличается от таковой в печени без опухоли в 15–24 мес (см. табл. 1, рис. 1) [10].

Увеличение F на 5–10-й дни постнатального развития у мышей С57В1 связано с установлением системы контактов, характерных для дефинитивной

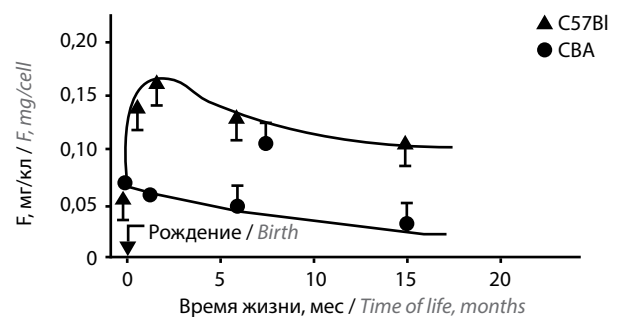
Рис. 1. Сила взаимной адгезивности гепатоцитов (F) самцов мышей высокоракетной (СВА) и низкоракетной (С57В1) линий в онтогенезе

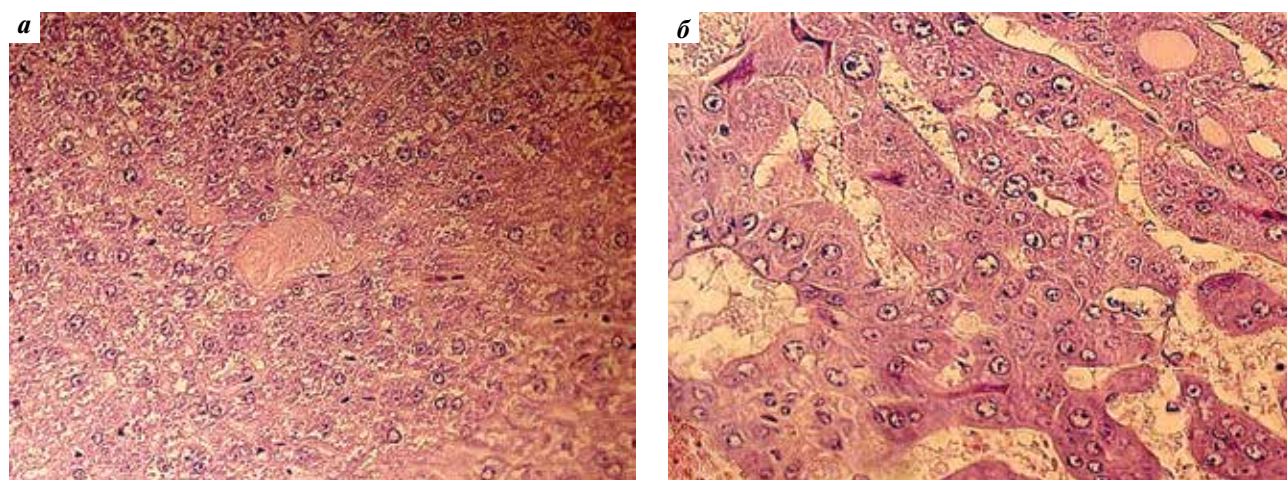
Fig. 1. The hepatocytes mutual adhesiveness force of high-cancer (CBA) and low-cancer (C57Bl) male mice in ontogenesis

печеночной балки, и является «критическим» для завершения дифференцировки ткани печени [12].

Таким образом, нарушение взаимной адгезивности гепатоцитов у самцов мышей СВА обусловлено дефицитом тканеспецифических (вероятно, из семейства кадхеринов) адгезионных факторов и возникает уже в раннем онтогенезе (5–10-й дни постнатального развития). Это нарушение сохраняется и усугубляется в процессе гепатоканцерогенеза.

Таблица 2. Частота и размер опухолей печени у самцов мышей СВА в онтогенезе ($M \pm SEM$)Table 2. The frequency and size of liver tumors in CBA male mice in ontogenesis ($M \pm SEM$)

Возраст мышей, мес Age of mice, months	Количество мышей Number of mice	Количество мышей с опухолями, n (%) Number of mice with tumours, n (%)	Число опухолей на мыш Number of tumors per mouse	Объем одной опухоли, мм ³ The volume of one tumour, mm ³	Общий объем опухолей на мыш, мм ³ The total volume of tumors per mouse, mm ³
8	40	6 (15)	$0,2 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,4$	$5,4 \pm 3,0$
12	32	13 (40,6)	$1,2 \pm 0,1$	$4,8 \pm 1,3$	—
22	38	38 (100)	$2,8 \pm 0,3$	$387,0 \pm 58,3$	$1069,5 \pm 190,3$

Рис. 2. Примеры гистологических препаратов опухолей печени мышей СВА (окраска гематоксилином и эозином): а — умеренно дифференцированная трабекулярная гепатокарцинома. $\times 200$; б — низкодифференцированная трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома. $\times 400$ Fig. 2. Examples of histological specimens of CBA mouse liver tumors (staining with hematoxylin and eosin): a — moderately differentiated trabecular hepatocarcinoma. $\times 200$; б — poor differentiated trabecular-acinar hepatocarcinoma. $\times 400$.

В результате у самцов мышей СВА частота, количество и объем опухолей печени в онтогенезе возрастают (табл. 2). Из данных табл. 2 видно, что в 8 мес частота опухолей составила 15 %, повысилась до 40,6 % в возрасте 12 мес и до 100 % в возрасте 22 мес. Также увеличились число опухолей на 1 животное (с $0,2 \pm 0,1$ до $2,8 \pm 0,3$), объем 1 опухоли (с $2,2 \pm 0,4$ до $387,0 \pm 58,3$ мм³) и общий объем опухолей на 1 животное (с $5,4 \pm 3,0$ до $1069,5 \pm 190,3$ мм³) [13–16].

При гистологическом исследовании опухоли печени самцов мышей СВА были определены как умеренно дифференцированные трабекулярные гепатокарциномы в возрасте 8 мес и низкодифференцированные трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы в возрасте 22 мес (рис. 2) [16, 17].

Усиление тканевой интеграции, в том числе при спонтанном канцерогенезе, имеет значение для снижения частоты опухолей. Это было показано на самцах мышей СВА при кратковременном применении в раннем постнатальном периоде (в течение 1-го месяца жизни) контактина — эндогенного тканеспецифического адгезионного фактора, а также экстракта

родии розовой — неспецифического адгезионного фактора: взаимная адгезивность клеток ткани-мишени долговременно повышалась, частота спонтанных опухолей существенно снижалась. Так, при введении контактина число опухолей печени у мышей в возрасте 13–15 мес уменьшилось на 40 % по сравнению с контролем. В результате применения экстракта родии розовой ни у одного из 21 животного в возрасте 12–13 мес опухоли не были выявлены. При этом было отмечено усиление функциональной активности Т-лимфоцитов. Введение адгезионных факторов в другие периоды онтогенеза не повлияло на частоту опухолей [13, 18, 19]. Эти результаты легли в основу открытия явления увеличения сил сцепления при межклеточном взаимодействии в эпителиальных тканях и повышения интеграции клеток ткани-мишени на заключительном этапе ее дифференцировки в раннем постнатальном онтогенезе, формирующего устойчивость ткани к возникновению опухолей [12].

Выявленная таким образом существенная роль коррекции ослабленной взаимной адгезивности клеток эпителиальных тканей (на примере гепатоцитов

мышей СВА) в снижении частоты спонтанных опухолей характеризует систему тканевой интеграции не только как важное звено в формировании и поддержании устойчивости ткани к бластоогенезу, но и как ключевую мишень для поиска профилактических воздействий в отношении спонтанного канцерогенеза [20, 21].

Экспрессия $\beta 2$ -лейкоцитарных интегринов и уровень интерлейкинов 6 и 10 в сыворотке крови самцов мышей СВА

Нарушение иммуоадгезионных взаимодействий имеет значение для экранирования опухоли от иммунологического надзора, способствуя тем самым ее инвазии и метастазированию. В эпителиальных тканях, предрасположенных к спонтанному возникновению опухолей, усиления прочности межклеточных контактов в раннем онтогенезе не происходит, что обусловлено дефицитом тканеспецифических молекул адгезии, вероятно, из семейства кадхеринов. Возникающее, как следствие, в более поздний период снижение экспрессии гистонеспецифических молекул адгезии ICAM (intercellular adhesion molecules) сверхсемейства иммуноглобулинов на опухолевых клетках индуцирует ослабление экспрессии на эффекторах иммунитета соответствующих лигандов из семейства $\beta 2$ -лейкоцитарных интегринов, LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen, integrin $\alpha L\beta 2$, CD11a/CD18) и Mac-1 (monocyte adhesion complex, integrin $\alpha M\beta 2$, CD11b/CD18), что, в свою очередь, способствует снижению противоопухолевых иммунных реакций организма, ограничивая элиминацию клеток-мишеней эффекторами иммунитета, в том числе цитотоксическими лимфоцитами [22, 23]. Эти события явно прослеживаются на самцах мышей линии СВА.

Нарушение регуляторных сигналов адгезионных процессов связано и с активностью ряда цитокинов как медиаторов межклеточных взаимодействий. В частности, повышенный уровень интерлейкинов (ИЛ) 6 и 10, как и слабая экспрессия молекулы адгезии ICAM-1, сопровождается подавлением иммунных функций [24].

У самцов мышей СВА спонтанный гепатоканцерогенез связан с ослаблением в онтогенезе экспрессии молекул $\beta 2$ -лейкоцитарных интегринов LFA-1 (CD11a) и Mac-1 (CD11b) на эффекторах иммунитета периферической крови, а также повышением концентрации ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови (рис. 3) [25–28].

Таким образом, при спонтанном гепатоканцерогенезе нарушаются как тканеспецифические гомотипические, т. е. контактные, взаимодействия между клетками печени (взаимная адгезивность), так и гетеротипические адгезионные взаимодействия между опухолевыми клетками и эффекторами иммунитета

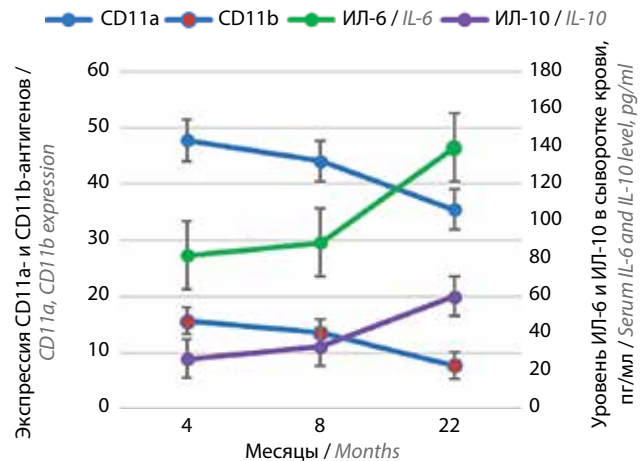


Рис. 3. Экспрессия CD11a- и CD11b-антигенов на клетках периферической крови, а также уровень интерлейкинов 6 (ИЛ-6) и 10 (ИЛ-10) в сыворотке крови самцов мышей СВА в онтогенезе

Fig. 3. CD11a, CD11b expression on peripheral blood cells, as well as the serum interleukins 6 (IL-6) and 10 (IL-10) level in CBA male mice in ontogenesis

(определяемые по снижению экспрессии $\beta 2$ -лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1). Полученные результаты могут свидетельствовать об ослаблении цитотоксической активности Т-лимфоцитов.

Вместе с тем негативно влиять на цитотоксическую активность Т-лимфоцитов может и повышение содержания ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови. Стимуляции образования антител, экранирующих антигены опухолевых клеток, способствует возросший уровень ИЛ-6 [29]. Повышение уровня ИЛ-10 может само по себе активировать еще большее возрастание содержания ИЛ-6, подавлять экспрессию молекул адгезии ICAM-1 на клетках-мишенях, синтез цитотоксических реактивных интермедиатов кислорода и азота, а также продукцию интерферона γ , ИЛ-2, ИЛ-12 и фактора некроза опухолей в том числе Т-лимфоцитами, NK-клетками и др. [30, 31]. Все эти события способствуют ускользанию опухоли от иммунобиологического надзора. В результате в том числе можно объяснить наличие гепатокарцином у 100 % мышей в возрасте 22 мес.

Значение коррекции экспрессии $\beta 2$ -лейкоцитарных интегринов, уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 в сыворотке крови у самцов мышей СВА было продемонстрировано на примере воздействия мультифитоадаптогена. Профилактическое (кратковременно в течение 1-го месяца жизни, включая 5–10-й дни постнатального развития) и лечебное (длительно, начиная с 6 мес, когда у мышей начинают возникать опухоли, и до естественной гибели животных) применение мультифитоадаптогена повышало иммунореактивность экспериментальных животных, что выражалось в инфильтрации спонтанных гепатокарцином цитотоксическими CD8⁺-лимфоцитами [32, 33]. Продemonстрировано

уменьшение частоты возникновения опухолей печени (на 30 %), количества и размеров спонтанных гепатокарцином. Средняя продолжительность жизни мышей увеличилась на 20 % при сохранении в онтогенезе стабильной массы тела, двигательной активности, качества шерсти без алопеции [15, 16, 34, 35].

Следует отметить, что за рубежом одни из перспективных индукторов противоопухолевого Т-клеточного иммунитета, и в частности инфильтрации опухолей цитотоксическими Т-лимфоцитами, «первые-в-своем-классе» (first-in-class), синтетической природы (по международной базе данных Cortellis Drug Discovery Intelligens), находятся в настоящее время в I фазе клинических испытаний. Среди них агонист адгезионной молекулы LFA-1 (7HP349, Hills Pharma, США) [36], а также агонист Mac-1 (ADN-503, Leukadherin-1 choline, Gossamer Bio, США) [37]. Приведенные данные подтверждают выводы, результаты и актуальность наших работ.

Гормональный дисбаланс у самцов мышей CBA: тестостерон и кортикостерон

Результаты наших исследований показывают, что у самцов мышей CBA с возрастом постепенно снижается уровень тестостерона (мощного промотора опухолей печени) в сыворотке крови, что согласуется с большей восприимчивостью самцов мышей к развитию гепатокарцином по сравнению с самками. В то же время отмечено увеличение в крови концентрации кортикостерона (рис. 4) [38, 39]. Выявленный дисбаланс анаболического тестостерона и катаболического кортикостерона способствует усилению деструктивных процессов в тканях, в частности в лимфоидных органах.

Вместе с тем для канцерогенеза характерны показатели хронического стресса, сопровождающегося

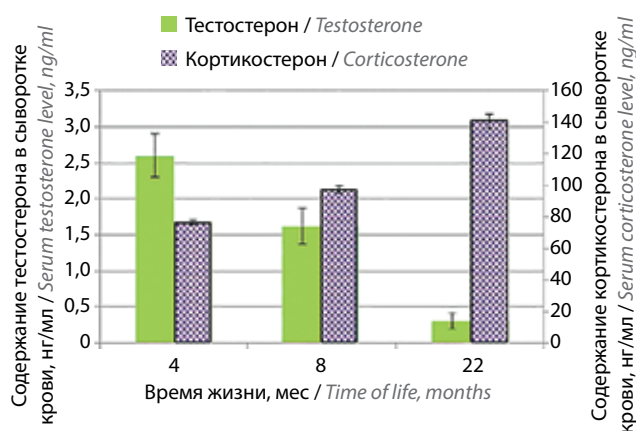


Рис. 4. Содержание тестостерона и кортикостерона в сыворотке крови самцов мышей CBA в онтогенезе

Fig. 4. Serum testosterone and corticosterone level in CBA male mice in ontogenesis

усиленной выработкой кортикостерона. Действительно, у самцов мышей CBA к 22-месячному возрасту отмечено возрастание концентрации кортикостерона в крови практически вдвое по сравнению с возрастом 4 мес. Из литературы известно, что, например, повышенный уровень кортизола индуцирует апоптоз лимфоцитов крови, вызывая подавление иммунореактивности организма [40]. Параллельно с этим при высоком уровне кортикостерона у самцов мышей CBA наблюдается снижение двигательной активности. Выявленный гиперкортицизм, очевидно, является отрицательным фактором, способствующим развитию гепатокарцином и процессов старения.

При этом уровни анаболического гормона тестостерона и катаболического стресс-гормона кортикостерона — важные характеристики адаптационных реакций организма и качества жизни. Возможность коррекции их дисбаланса как при опухолевой патологии, так и при старении может в том числе обеспечить повышение качества жизни и геропротекторный эффект.

Продолжительность жизни и соматический статус самцов мышей CBA

Общая выживаемость самцов мышей CBA ($n = 116$) отражена на рис. 5 (анализировали по методу Каплана—Майера). Средняя продолжительность жизни самцов мышей CBA составила $671,2 \pm 13,8$ дня (22 мес), а медиана общей выживаемости — 638 дней (21 мес). Более 1000 дней не прожило ни одно животное. Максимальная продолжительность жизни определена как 990 дней (32,5 мес), минимальная — 435 дня (14,3 мес) [34, 35].

Следует отметить, что средняя продолжительность жизни самцов мышей CBA (примерно 2-летний период) при высокой частоте опухолей в позднем онтогенезе сравнима с таковой у здоровых мышей без опухолевых патологий. Этот факт дает возможность

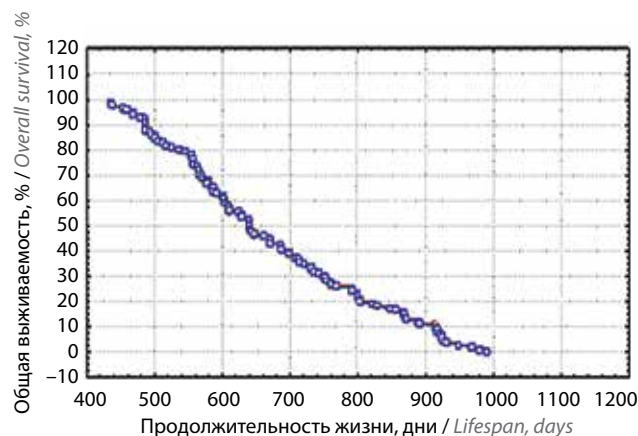


Рис. 5. Общая выживаемость самцов мышей CBA ($n = 116$)

Fig. 5. Overall survival of CBA male mice ($n = 116$)

оценивать в онтогенезе эффекты препаратов для профилактической онкологии с противоопухолевой и геропротекторной направленностью с объективной экстраполяцией на человека. При хронобиологическом переносе возраста мышей на человека самцы мышей CBA живут около 62 лет.

При оценке соматического статуса мышей CBA исследовали динамику массы тела, двигательную (поведенческую) активность животных и качество шерстного покрова.

Как видно из табл. 3, масса тела самцов мышей CBA достоверно увеличивалась в период с 4 до 8 мес. В позднем онтогенезе (в возрасте 22 мес) среднее значение массы тела животных снизилось по сравнению с 8-месячным возрастом на 16 % [34, 35]. Кахексия, выраженная у самцов мышей CBA, может быть связана как с развитием опухолевого процесса, так и с закономерным старением организма. Вместе с тем у мышей в 22 мес в сыворотке крови увеличены уровни ИЛ-6 и ИЛ-10, участвующих в патогенезе кахексии, в частности способствуя повышению содержания С-реактивного белка и расщеплению мышечных белков [41, 42].

Как следует из табл. 4, у самцов мышей CBA к 22-месячному возрасту наблюдали снижение двигательной активности с учетом показателей пройден-

ного пути, времени без движения, числа «стоек» и мелких движений.

Шерстный покров в 22 мес у большинства из исследованных животных был полноценным. Признаки алопеции шерстного покрова встречались в 18 % случаев (у 8 из 45 животных). На рис. 6 в качестве примера представлены фотографии мышей в 22 мес.

Таким образом, у самцов мышей CBA в онтогенезе наблюдали ослабление двигательной активности, снижение массы тела и признаки алопеции в шерстном покрове.

Оценка числа дофаминергических нейронов и уровня нейрогенеза у самцов мышей CBA

Обеспечение адгезионных взаимодействий между эффекторами иммунитета и клетками-мишенями может находиться в том числе и под контролем центральных механизмов с участием одного из основных нейромедиаторов — катехоламина дофамина. Из литературы известны его геропротекторные, антидепрессантные, стресс-регулирующие и противоопухолевые свойства. При этом центральный дофамин прямо влияет на уровень дофамина в периферическом организме. Будучи продукцией в том числе и лимфоцитов, периферический дофамин участвует в активной фазе реакций иммунитета против опухоли, способствуя дифференцировке цитотоксических лимфоцитов, их миграции в опухолевые узлы и образованию конъюгатов с опухолевыми клетками [43, 44].

У самцов мышей CBA ослабление иммуноадгезионных взаимодействий в онтогенезе, динамика показателей хронического стресса и процесса закономерного старения при возрастании стресс-гормона кортикостерона, снижении анаболического гормона тестостерона в сыворотке крови, ослаблении двигательной активности, возникновении признаков кахексии, появлении участков алопеции в шерстном покрове животных определены параллельно с потерей численности дофаминергических нейронов (табл. 5). Так, у молодых половозрелых (3–4 мес) самцов мышей CBA количество дофаминергических нейронов составило 11824 ± 480 . При спонтанном гепатоканцерогенезе

Таблица 3. Динамика массы тела самцов мышей CBA в онтогенезе ($M \pm SEM$)

Table 3. Body weight dynamics of CBA male mice in ontogenesis ($M \pm SEM$)

Возраст мышей, мес Age of mice, months	Количество мышей Number of mice	Масса тела, г Body weight, g
4	30	$30,4 \pm 0,3$
8	30	$32,0 \pm 0,3^*$
22	30	$27,0 \pm 0,6^{**}$

*Достоверность различий в 4 и 8 мес, $p \leq 0,01$; **достоверность различий в 8 и 22 мес, $p = 0,0008$.

*Reliability of differences 4 and 8 months, $p \leq 0,01$; **Reliability of differences at 4 and 8 months, $p = 0,0008$.

Таблица 4. Двигательная активность самцов мышей CBA ($M \pm SEM$)

Table 4. Motor activity of CBA male mice ($M \pm SEM$)

Возраст мышей, мес Age of mice, months	Количество мышей Number of mice	Пройденный путь, см Distance traveled, cm	Время без движения, с Time without movement, s	Число «стоек» Number of "stance"	Число мелких движений Number of small movements
4	10	$1420,6 \pm 85,5$	$55,0 \pm 5,9$	$20,3 \pm 3,0$	$310,4 \pm 17,8$
22	10	$1000,8 \pm 52,0^*$	$83,8 \pm 6,1^*$	$11,1 \pm 1,0^*$	$217,8 \pm 10,7^*$

* $p < 0,05$.

Таблица 5. Количество дофаминергических нейронов и пролиферирующих нейронов (Ki-67-позитивных клеток) у самцов мышей CBA ($M \pm SEM$)
Table 5. Number of dopaminergic neurons and proliferating neurons (Ki-67-positive cells) in CBA male mice ($M \pm SEM$)

Возраст мышей, мес Age of mice, months	Количество мышей Number of mice	Количество дофаминергических нейронов Number of dopaminergic neurons	Количество Ki-67-позитивных клеток Number of Ki-67-positive cells
3–4	6	$11824,0 \pm 479,6$	$116,2 \pm 8,3$
21–22	18	$8460,0 \pm 343,4^*$	$13,9 \pm 1,6^{**}$

* $p = 0,0002$; ** $p = 0,0001$.

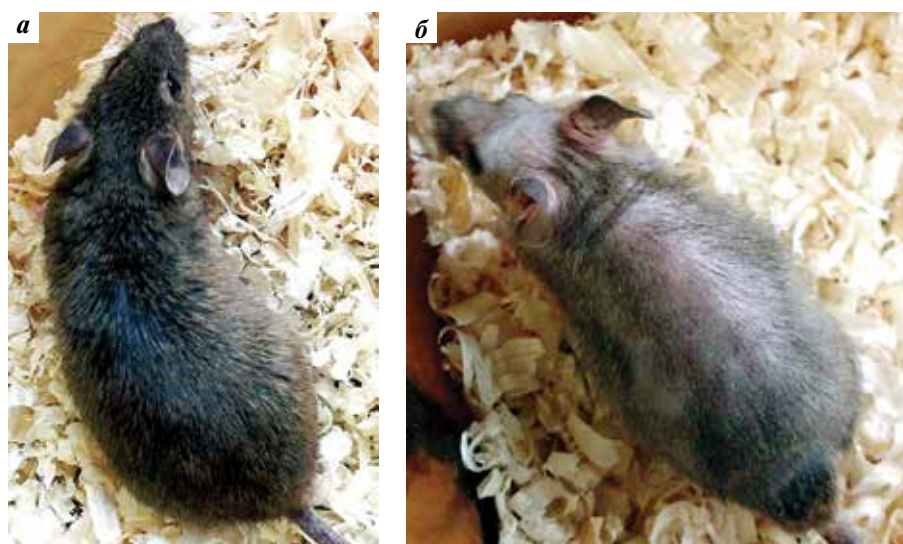


Рис. 6. Самцы мышей CBA в возрасте 22 мес: а – с полноценным шерстным покровом; б – с выраженными признаками алопеции
Fig. 6. CBA male mice at the age of 22 months: a – with full coat; б – with pronounced alopecia

и на фоне старения отмечено их статистически достоверное уменьшение до 8460 ± 343 ($p = 0,0002$). Число пролиферирующих нейронов, экспрессирующих Ki-67, у самцов мышей CBA в возрасте 3–4 мес составило $116,0 \pm 8,3$. В позднем онтогенезе показатель снизился до $13,9 \pm 1,6$ [45].

Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что снижение числа центральных дофаминергических нейронов (и, соответственно, дофамина в головном мозге) может приводить к уменьшению содержания периферического дофамина, что способствует, в свою очередь, подавлению пролиферации лимфоцитов и продукции ими ИЛ-2, интерферона γ , уменьшению количества НК-клеток и цитотоксических CD8⁺-лимфоцитов, ослаблению их способности формировать конъюгаты с клетками-мишенями. Все это вносит вклад в ослабление иммунореактивности организма против опухоли [46–48]. Следовательно, с позиций центральных нейрональных нарушений снижение числа дофаминергических нейронов у самцов мышей CBA выступает в качестве адгезиоповреждающего фактора, ослабля-

ющего взаимодействия эффекторов иммунитета и возникающих при мутациях опухолевых клеток.

Заключение

Самцы мышей высокорасовой линии CBA с оценкой в онтогенезе комплекса параметров, характеризующих адгезионные и адаптационные нарушения при спонтанном канцерогенезе (F, экспрессия $\beta 2$ -лейкоцитарных интегринов LFA и Mac-1 на клетках периферической крови, содержание ИЛ-6, ИЛ-10, кортикостерона и тестостерона в сыворотке крови, число дофаминергических нейронов в среднем мозге), а также частоту и размер опухолей, продолжительность жизни и соматический статус животных, несмотря на продолжительность экспериментов, могут использоваться в качестве научно обоснованной и доказательной тест-системы для изучения препаратов-цитостатиков, а также нетоксичных геропротекторов для профилактики и лечения онкозаболеваний у лиц с повышенным риском развития злокачественных новообразований, особенно гепатоцеллюлярной карциномы.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Sultana R., Ogundele O.M., Lee C.C. Contrasting characteristic behaviours among common laboratory mouse strains. *R Soc Open Sci* 2019;6(6):19054. DOI: 10.1098/rsos.190574
- Park S.-K., Kim K., Page G.P. et al. Gene expression profiling of aging in multiple mouse strains: identification of aging biomarkers and impact of dietary antioxidants. *Aging Cell* 2009;8(4):484–95. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2009.00496.x
- Strong L.C., Smith G.M. Benign hepatomas in mice of the CBA strain. *Am J Cancer* 1936;27:279–84.
- Медведев Н.Н. Линейные мыши. Л.: Медицина, 1964. 230 с. Medvedev N.N. Line mice. Leningrad: Meditsina, 1964. 230 p. (In Russ.).
- Tillman T., Kamino K., Mohr U. Incidence and spectrum of spontaneous neoplasms in male and female CBA/J mice. *Exp Toxicol Pathol* 2000;52(3):221–5. DOI: 10.1016/S0940-2993(00)80032-9
- Фактор В.М., Шипова Л.Я. и др. Уровень клеточной ДНК в спонтанных гепатомах мышей линии CBA. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1984;97(6):710–3. Factor V.M., Shipova L.Ya. et al. The level of cellular DNA in spontaneous hepatomas of CBA mice. *Byulleten experimentalnoy biologii i meditsiny* = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 1984;97(6):710–3. (In Russ.).
- Bilger A., Bennett L., Carabeo R. et al. A potent modifier of liver cancer risk on distal mouse chromosome 1: linkage analysis and characterization of congenic lines. *Genetics* 2004;167(2):859–66. DOI: 10.1534/genetics.103.024521
- Coman D.R. Decreased mutual adhesiveness, a property of cells from squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 1944;4(10):625–9.
- Coman D.R. Cellular adhesiveness in relation to the invasiveness of cancer; electron microscopy of liver perfused with a chelating agent. *Cancer Res* 1954;14(7):519–21.
- Бочарова О.А., Модянова Е.А. Изменение межклеточных контактов гепатоцитов в онтогенезе у мышей инбредных линий с высокой и низкой частотой спонтанных гепатом. Онтогенез 1982;13(4):427–9. Bocharova O.A., Modyanova E.A. Changes in the intercellular contacts of hepatocytes in the ontogeny of inbred mouse strains with a high (CBA) and low (C57BL) frequency of spontaneous hepatomas. *Ontogenez* = Ontogenesis 1982;13(4):427–9. (In Russ.).
- Бочарова О.А., Модянова Е.А. Динамика межклеточных контактов при канцерогенезе печени, индуцированном подкожным введением ортоаминоазотолуола. Вопросы онкологии 1982;(9):53–7. Bocharova O.A., Modyanova E.A. Dynamics of intercellular contacts during liver carcinogenesis induced by subcutaneous administration of orthoaminoazotoluene. *Voprosy onkologii* = Problems in Oncology 1982;(9):53–7. (In Russ.).
- Маленков А.Г., Бочарова О.А., Модянова Е.А. Явление увеличения сил сцепления при межклеточном взаимодействии в эпителиальных тканях в раннем постнатальном периоде. Открытие № 330, зарегистрированное в государственном реестре открытий СССР. Бюллетень открытий и изобретений СССР 1987;(42):3–10. Malenkov A.G., Bocharova O.A., Modyanova E.A. The phenomenon of adhesion forces increasing during intercellular interaction in epithelial tissues in the early postnatal period. *Discovery No. 330, registered in the USSR State Register of Discoveries. Bulletin otkrytiy i izobreteniy SSSR* = USSR Bulletin of Discoveries and Inventions 1987;(42):3–10. (In Russ.).
- Бочарова О.А., Серебрякова Р.В., Бодрова Н.Б. Профилактический эффект *Rhodiola rosea* на спонтанное опухолеобразование в печени на модели высококорактовой линии мышей. Вестник РАМН 1994;(5):41–3. Bocharova O.A., Serebryakova R.V., Bodrova N.B. Preventive effect of *Rhodiola rosea* in a mice model of high-tumour strain. *Vestnik RAMN* = Annals of the RAMS 1994;(5):41–3. (In Russ.).
- Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.В. и др. Снижение возникновения гепатом при воздействии фитоадаптогена у высококорактовых мышей CBA. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(2):73–6. Bocharova O.A., Bocharov E.V., Karpova R.V. et al. Reducing the hepatomas frequency in high-tumour CBA mice under the phytoadaptogen administration. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(2):73–6. (In Russ.).
- Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Соловьев Ю.Н. Воздействие фитоадаптогена на возникновение гепатом у высококорактовой линии мышей CBA. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2015;159(5):655–7. DOI: 10.1007/s10517-015-3040-4 Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V., Solovyov Yu.N. Effects of phytoadaptogen on hepatoma development in cancer-prone CBA mice. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny* = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2015;159(5):655–7. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-015-3040-4
- Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Снижение роста спонтанных опухолей печени у мышей линии CBA при профилактическом воздействии сухим экстрактом фитоадаптогена. Лабораторные животные для научных исследований 2022;1:8–15. DOI: 10.29296/2618723X-2022-01-02 Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. Spontaneous tumours growth reducing in CBA mice under phytoadaptogen dry extract preventive influence. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy* = Laboratory Animals for Science 2022;1:8–15. (In Russ.). DOI: 10.29296/2618723X-2022-01-02
- Бочаров Е.В., Бочарова О.А., Соловьев Ю.Н. и др. Морфологические исследования гепатокарцином мышей-самцов высококорактовой линии CBA при воздействии фитоадаптогена. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2016;161(5):727–30. DOI: 10.1007/s10517-016-3495-y Bocharov E.V., Bocharova O.A., Solovyov Yu.N. et al. Morphological studies of hepatocellular carcinomas in male CBA mice with high liability to cancer under the effect of phytoadaptogen. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny* = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2016;161(5):727–30. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-016-3495-y
- Модянова Е.А., Бочарова О.А., Маленков А.Г. Профилактическое действие контактинов-кейлонов на спонтанный канцерогенез у линейных мышей. Экспериментальная онкология 1983;5(3):39–42. Modyanova E.A., Bocharova O.A., Malenkov A.G. Preventive effect of contactin-keylons on spontaneous carcinogenesis in linear mice. *Experimentalnaya onkologiya* = Experimental Oncology 1983;5(3):39–42. (In Russ.).
- Бочарова О.А., Серебрякова Р.В. Испытание препаратов растительного происхождения для профилактики и нетоксической терапии онкологических заболеваний на экспериментальных моделях. Вестник РАМН 1994;(2):52–5. Bocharova O.A., Serebryakova R.V. Testing of plant extracts preparations for prevention and non-toxic therapy of oncologic diseases in experimental models. *Vestnik RAMN* = Annals of the RAMS 1994;(2):52–5. (In Russ.).
- Бочарова О.А. Адгезионные взаимодействия в биологии рака. Вестник РАМН 2002;(1):22–5. Bocharova O.A. Adhesion interactions in cancer biology. *Vestnik RAMN* = Annals of the RAMS 2002;(1):22–5. (In Russ.).

21. Бочарова О.А., Матвеев В.Б., Бочаров Е.В. и др. Концепция адгезии в биологии рака: местные и центральные механизмы (часть 1). Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3):17–24. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-17-24 Bocharova O.A., Matveev V.B., Bocharov E.V. et al. The concept of adhesion in cancer biology: local and central mechanisms (part 1). Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):17–24. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-17-24
22. Harjunpää H., Asens M.L., Guenther C., Fagerholm S.C. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. Front Immunol 2019;10:1078. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01078
23. Bednarczyk M., Stege H., Grabbe S., Bros M. $\beta 2$ Integrins – multi-functional leukocyte receptors in health and disease. Int J Mol Sci 2020;21(4):1402. DOI: 10.3390/ijms21041402
24. Pop V.V., Seicean A., Lupan I. et al. IL-6 roles – molecular pathway and clinical implication in pancreatic cancer – a systemic review. Immunol Lett 2017;181:45–50. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.11.010
25. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А. и др. Лейкоцитарные интегрин при гепатоканцерогенезе мышей высоко-раковой линии CBA. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(3):53–6. Bocharova O.A., Karpova R.V., Ilyenko V.A. et al. Leukocyte integrins at hepatocarcinogenesis in high-cancer CBA strain of mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2013;12(3):53–6. (In Russ.).
26. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.В. и др. LFA-1, Mac-1 интегрин и IL-6, -10 цитокины у высоко-раковых мышей под воздействием фитоадаптогена. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2014;157(2):258–60. DOI: 10.1007/s10517-014-2539-4 Bocharova O.A., Bocharov E.V., Karpova R.V. et al. Integrins LFA-1 and Mac-1 and cytokines IL-6 and IL-10 in high-cancer mice under the influence of phytoadaptogen. Bulletin experimental biology and medicine 2014;157(2):258–60. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-014-2539-4
27. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. $\beta 2$ -интегрин LFA-1 и Mac-1 – мишень для усиления иммунитета против опухоли. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(1):53–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-53-58 Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. LFA-1, Mac-1 leukocyte integrins – target for tumor immunity magnification. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(1):53–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-53-58
28. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Регуляция интерлейкинов 6 и 10 сухим экстрактом фитоадаптогена для профилактики спонтанных гепатокарцином. Лабораторные животные для научных исследований 2021;4:3–9. DOI: 10.29296/2618723X-2021-04-01 Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. Interleukins 6 and 10 regulation with dry phytoadaptogene extract for the prevention of spontaneous hepatocarcinomas. Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy = Laboratory Animals for Science 2021;4:3–9. (In Russ.). DOI: 10.29296/2618723X-2021-04-01
29. Jones S.A., Richards P.J., Scheller J., Rose-John S. IL-6 transsignalling: the *in vivo* consequences. J Interferon Cytokine Res 2005;25(5):241–53. DOI: 10.1089/jir.2005.25.241
30. Moore K.W., Malefyt R.W., Coffman R.L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 2001;19:683–765. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683
31. Peppas D., Micco L., Javadi A. et al. Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection. PLoS Pathog 2010;16(2):e1001227. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001227
32. Bocharova O.A., Revishchin A.V., Bocharov E.V. et al. Prognostically relevant tumour infiltrating lymphocytes profile in CBA mice under multiphytoadaptogene complex dry powder preventive administration. Reviews on clinical pharmacology and drug therapy 2019;17(Suppl 1):8.
33. Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Бочарова О.А. и др. Влияние фитоадаптогена на лейкоцитарную инфильтрацию гепатокарцином мышей. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(2):60–5. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-60-65 Karpova R.V., Bocharov E.V., Bocharova O.A. et al. The influence of multiphytoadaptogen on leukocyte infiltration in mice hepatocarcinomas. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(2):60–5. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-60-65
34. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Воздействие мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе, улучшающее выживаемость и соматическое состояние мышей высоко-раковой линии. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(1):76–81. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-76-81 Bocharov E.V., Karpova R.V., Bocharova O.A. et al. Multiphytoadaptogene administration in early postnatal ontogenesis improve life-span and physical status of high-cancer mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(1):76–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-76-81
35. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Иммуноадгезивные механизмы профилактического действия фитоадаптогена на спонтанный гепатоканцерогенез. Лабораторные животные для научных исследований 2019;1:2–14. DOI: 10.29296/2618723X-2019-01-01 Bocharov E.V., Karpova R.V., Bocharova O.A. et al. Immunoadhesive mechanisms of phytoadaptogen preventive action on spontaneous hepatocarcinogenesis. Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy = Laboratory Animals for Science 2019;1:2–14. (In Russ.). DOI: 10.29296/2618723X-2019-01-01
36. Hickman A., Koetsier J., Kurtanich T. et al. LFA-1 activation enriches tumor-specific T cells in a cold tumor model and synergizes with CTLA-4 blockade. J Clin Invest 2022;132(13):e154152. DOI: 10.1172/JCI154152
37. Panni R.Z., Herndon J.M., Zuo C. et al. Agonism of CD11b reprograms innate immunity to sensitize pancreatic cancer to immunotherapies. Sci Transl Med 2019;11(499):eaau9240. DOI: 10.1126/scitranslmed.aau9240
38. Bocharov E.V., Bocharova O.A., Karpova R.V. et al. Effect of multiphytoadaptogene dry powder extract on serum testosterone level in highly carcinogenic CBA male mice. Reviews on clinical pharmacology and drug therapy 2016;1(S):12.
39. Bocharov E.V., Bocharova O.A., Karpova R.V. et al. Effect of multiphytoadaptogene dry powder extract on serum corticosterone level in CBA highly carcinogenic mice. Reviews on clinical pharmacology and drug therapy 2016;1(S):12–13.
40. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Физиология естественных киллеров. М.: Медицина – Здоровье, 2005. 455 с. Sepiashvili R.I., Balmasova I.P. Physiology of natural killers. M.: Meditsina – Zdorovie, 2005. 455 p.
41. Deans D., Tan B., Ross J. et al. Cancer cachexia is associated with the IL10-1082 gene promoter polymorphism in patients with gastroesophageal malignancy. Am J Clin Nutr 2009;89(4):1164–72. DOI: 10.3945/ajcn.2008.27025
42. Krzystek-Korpacka M., Matusiewicz M., Diakowska D. et al. Acute-phase response proteins are related to cachexia and accelerated angiogenesis in gastroesophageal cancers. Clin Chem Lab Med 2008;46(3):359–64. DOI: 10.1515/CCLM.2008.089
43. Moreno-Smith M., Lu C., Shahzad M.M. et al. Dopamine blocks stress-mediated ovarian carcinoma growth. Clin Cancer Res 2011;17(11):3649–59. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2441

44. Magnini F., Sabbatini M., Capacchietti M. et al. T-cell subpopulations express a different pattern of dopaminergic markers in intra- and extra-thymic compartments. *J Biol Regul Homeost Agents* 2013;27(2):463–75. PMID: 23830396.
45. Бочарова О.А., Ревещин А.В., Бочаров Е.В. и др. Возможности регуляции численности дофаминергических нейронов в профилактике гепатокарцином. Лабораторные животные для научных исследований 2021;(2):47–53.
Bocharova O.A., Revishchin A.V., Bocharov E.V. et al. Possibility of dopaminergic neurons number regulation in the hepatocarcinomas prevention. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy = Laboratory Animals for Science* 2021;(2):47–53. DOI: 10.29296/2618723X-2021-02-06
46. Альперина Е.Л. Вклад дофаминергической системы в механизмы иммуномодуляции. Успехи физиологических наук 2014;45(3):45–56.
Alperina E.L. The contribution of the dopaminergic system to the mechanisms of immunomodulation. *Uspehy fiziologicheskikh nauk = Progress in physiological science* 2014;45(3):45–56. (In Russ.).
47. Schiller M., Ben-Shaanan T.L., Rolls A. Neuronal regulation of immunity: why, how and where? *Nat Rev Immunol* 2021;21(1):20–36. DOI: 10.1038/s41577-020-0387-1
48. Бочарова О.А., Матвеев В.Б., Бочаров Е.В. и др. Адгезионная концепция в биологии рака: местные и центральные механизмы (часть 2). Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):42–50.
Bocharova O.A., Matveev V.B., Bocharov E.V. et al. Adhesion concept in cancer biology: local and central mechanisms (part 2). *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(4):42–50. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-42-50

Вклад авторов

О.А. Бочарова: разработка дизайна исследования, планирование работы, анализ данных, анализ рукописи;
Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров: получение и анализ данных, написание текста рукописи, оформление рукописи;
А.А. Аксенов: получение данных для анализа;

В.Г. Кучеряну, А.В. Ревещин: получение и анализ данных;

Г.В. Павлова, Н.Е. Кушлинский: анализ рукописи.

Authors' contributions

O.A. Bocharova: research design, work planning, data analysis, manuscript analysis;

R.V. Karpova, E.V. Bocharov: data acquisition and analysis, manuscript writing, manuscript design;

A.A. Aksyonov: data acquisition for analysis;

V.G. Kucheryanu, A.V. Revishchin: data acquisition and analysis;

G.V. Pavlova, N.E. Kushlinsky: manuscript analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.А. Бочарова / O.A. Bocharova: <https://orcid.org/0000-0002-6365-2888>

Р.В. Карпова / R.V. Karpova: <https://orcid.org/0000-0003-4893-1472>

Е.В. Бочаров / E.V. Bocharov: <https://orcid.org/0000-0003-2342-9881>

А.А. Аксенов / A.A. Aksyonov: <https://orcid.org/0000-0001-6052-2132>

В.Г. Кучеряну / V.G. Kucheryanu: <https://orcid.org/0000-0002-5071-3581>

А.В. Ревещин / A.V. Revishchin: <https://orcid.org/0000-0002-6007-6440>

Г.В. Павлова / G.V. Pavlova: <https://orcid.org/0000-0002-6885-6601>

Н.Е. Кушлинский / N.E. Kushlinsky: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 05.08.2022. Принята к публикации: 31.08.2022.

Article submitted: 05.08.2022. Accepted for publication: 31.08.2022.

CD437 повышает захват железа клетками метастатической меланомы

А.А. Вартанян, Ю.А. Хоченкова, В.С. Косоруков

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

Контакты: Амалия Арташевна Вартанян zhivotov57@mail.ru

Введение. CD437, аналог витамина А, является агонистом γ -рецептора ретиноевой кислоты (RAR γ). Известно также, что CD437 вызывает p53-независимое повреждение ДНК с помощью механизма, независимого от пути, опосредованного RAR γ . У онкологических больных очень часто обнаруживается дефицит железа, а также нарушена доставка железа к тканям.

Цель исследования – изучение влияния CD437 на метаболизм железа в клетках метастатической меланомы.

Материалы и методы. В экспериментах были использованы: 2D-культивирование клеток метастатической меланомы Mel Z, фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия.

Результаты. В экспериментах с клетками меланомы линии Mel Z, не обработанными CD437 (контроль), рецептор трансферрина CD71 экспрессировали 40 ± 4 % клеток ($p < 0,05$), а при инкубации с CD437 количество клеток, экспрессирующих CD71, возрастало до 80 ± 6 % ($p < 0,05$). Далее мы исследовали экспрессию ферритина, связывающего железо, не участвующее в метаболизме клетки. В контрольных экспериментах ферритин экспрессировали 84 ± 6 % клеток ($p < 0,05$). При росте клеток в присутствии CD437 ферритин стали экспрессировать все клетки (100 %, $p < 0,05$). Подобный сценарий указывает на то, что CD437, по всей видимости, способствует накоплению в клетке свободного, несвязанного железа, которое может индуцировать ферроптоз. В контрольных экспериментах, без добавления CD437, уровень перекисного окисления липидов мембран, индикатора ферроптоза, был незначительным. Перекисное окисление липидов, индуцированное CD437, составляло 55 ± 5 % ($p < 0,05$) от интенсивности флуоресценции, индуцированной эрастином, положительным контролем.

Заключение. CD437 повышает захват железа клетками метастатической меланомы. Низкий уровень перекисного окисления липидов мембран, индуцированного CD437, не позволяет рассматривать его как индуктор ферроптоза. Нужны дополнительные исследования для поиска мишеней, связывающих железо, альтернативных ферритину.

Ключевые слова: меланома, железо, CD437, CD71, ферритин, ферроптоз

Для цитирования: Вартанян А.А., Хоченкова Ю.А., Косоруков В.С. CD437 повышает захват железа клетками метастатической меланомы. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):34–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-34-39

CD437 increases the iron uptake by metastatic melanoma cells

Amalia A. Vartanian, Yulia A. Khochenkova, Vyacheslav S. Kosorukov

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

Contacts: Amalia Artashevna Vartanian zhivotov57@mail.ru

Background. CD437, an analog of vitamin A, is an agonist of the retinoic acid γ -receptor (RAR γ). CD437 is also known to cause p53-independent DNA damage by a mechanism independent of the RAR-mediated pathway. In cancer patients, iron deficiency is constantly detected, the delivery of iron to tissues is also destroyed.

Aim. To study the effect of CD437 on iron metabolism in metastatic melanoma cells, Mel Z.

Materials and methods. In this study 2D cultivation of metastatic Mel Z melanoma cells, phase-contrast and fluorescence microscopy, flow cytometry were used.

Results. In control cells without the addition of CD437 CD71, transferrin receptor, expressed 40 ± 4 % ($p < 0,05$) of Mel Z cells, in the presence of CD437 CD71 expression increased to 80 ± 6 %. Next, we have studied the expression of ferritin. Iron, which is not involved in cell metabolism, is bound by ferritin. In control experiments, ferritin

was expressed by $84 \pm 6\%$ ($p < 0.05$) of cells. When the cells grew in the presence of CD437, ferritin was expressed by all the cells (100% , $p < 0.05$). Such a scenario indicates that CD437 may contribute to the accumulation of free, unbound iron in the cell, which can induce ferroptosis. In control experiments without the addition of CD437, the level of membranes lipid peroxidation, an indicator of ferroptosis, was insignificant. Lipid peroxidation induced by CD437 was $55 \pm 5\%$ ($p < 0.05$) of the fluorescence intensity induced by erastin, positive control.

Conclusion. CD437 increases the iron uptake by metastatic melanoma cells. The low level of membranes lipid peroxidation induced by CD437 does not allow it to be considered as an inducer of ferroptosis. Additional investigations are needed to find iron-binding targets alternative to ferritin.

Keywords: melanoma, iron, CD437, CD71, ferritin, ferroptosis

For citation: Vartanian A.A., Khochenkova Yu.A., Kosorukov V.S. CD437 increases the iron uptake by metastatic melanoma cells. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(3):34–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-34-39

Введение

Синтетический ретиноид 6-[3-(1-адамантил)-4-гидроксифенил]-2-нафталинкарбоновая кислота (CD437), аналог витамина А, является агонистом γ -рецептора ретиноевой кислоты (RAR γ) [1]. Его противоопухолевая активность была подтверждена на моделях ксенотрансплантатов животных, демонстрируя высокий потенциал для лечения и/или профилактики рака [2–4]. Интерес к аналогам витамина А вызвал феномен, наблюдаемый на многих опухолях, — концентрация витамина А в опухолевых клетках значительно снижена по сравнению со здоровыми клетками. Это сопровождается снижением экспрессии рецепторов ретиноевой кислоты и приводит к повышению экспрессии маркеров стволовой клетки опухоли и, следовательно, короткой безрецидивной выживаемости онкологических больных [5]. Эффект CD437 как агониста RAR γ был одной из первых описанных активностей этого ретиноида. CD437 избирательно связывается с RAR γ и трансактивирует рецептор, запуская дифференцировку клеток [6]. Активно обсуждается в литературе и способность CD437 вызывать p53-независимое повреждение ДНК с помощью механизма, независимого от пути, опосредованного RAR γ [7–9]. CD437-опосредованное повреждение ДНК объясняет, почему большинство клеток, независимо от их чувствительности к ретиноевой кислоте, отвечают на CD437. Недавно нами было получено экспериментальное подтверждение ингибирования миграционной и инвазивной активности клеток метастатической меланомы CD437 [10]. Многочисленные специфические реакции опухолевых клеток на этот ретиноид предполагают существование в опухолевой клетке нескольких мишеней его действия.

У онкологических больных дефицит железа обнаруживается очень часто [11]. Опухолевые клетки активно «изымают» из крови трансферрин (Tf), переносчик железа. Захват железа тем значительнее, чем больше масса самой опухоли и чем более она злокачественна [12, 13]. Одной из причин такого ак-

тивного поглощения железа опухолевыми клетками может быть необходимость этого металла как кофактора ДНК-полимеразного комплекса [14]. Железо также является активной частью дыхательных ферментов (при его недостатке ткани не могут усваивать кислород) и участвует в генерации аденозинтрифосфорной кислоты — источника биологической энергии в живых организмах [15, 16]. CD71, рецептор Tf, — практически единственный белок, доставляющий железо в клетку [17]. Следует отметить, что низкая экспрессия CD71 на опухолевых клетках коррелирует с меньшей частотой выявления метастазов и более длительной общей и безрецидивной выживаемостью больных [18]. Взаимодействие комплекса Tf/Fe³⁺ с рецептором CD71 приводит к интернализации комплекса CD71/Tf/Fe³⁺ в клетку. В клетке железо диссоциирует из комплекса и в основном используется для включения в гем или кофакторы ферментов. Железо, не участвующее в метаболизме клетки, депонируется в составе ферритина [19]. Ферритин позволяет клетке сохранять железо в нетоксичной форме, из которой оно может быть мобилизовано для синтеза гемоглобина и негемовых железосодержащих белков. Не связанное с ферритином свободное железо в результате окисления Fe²⁺ в Fe³⁺ (реакция Фентона: Fe²⁺ + H₂O₂ → Fe³⁺OH⁻ + •OH) и генерации радикала кислорода способствует накоплению в клетке активных форм кислорода [20]. Ферритин практически «обезвреживает» свободное, не использованное клеткой железо.

Меланома — одна из наиболее агрессивных злокачественных опухолей человека. В основе летальности меланомы лежит высокая подвижность клеток опухоли, что позволяет им метастазировать почти во все органы [21]. Из-за невысокой чувствительности меланомы к существующим противоопухолевым препаратам крайне редко удается достигнуть регрессии метастазов и добиться стойкой длительной ремиссии [22].

Цель настоящего исследования — изучение влияния CD437 на метаболизм железа в клетках метастатической меланомы.

Материалы и методы

Материалы. Ретиноид CD437 и эрастин были приобретены у Sigma-Aldrich Corporation (США). Антитела к CD71, FITC-конъюгированные, были получены от BD BioScience (США). C11-BODIPY приобретен у Thermo Fisher Scientific (США). Антитела к ферритину (clone F31) были любезно предоставлены О.Н. Солоповой.

Культура клеток. В работе использована клеточная линия меланомы Mel Z, выведенная из опухолевого материала пациента, находившегося на лечении в Научно-исследовательском институте клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 2 ммоль/мл глутамина и 0,1 мг/мл гентамицина. В экспериментах использовали клетки 70–75 % конфлюентности.

Определение экспрессии ферритина и CD71. Клетки Mel Z инкубировали с 1 мкМ CD437 в течение 24 ч при 37 °С. Фенотипирование антигенов клеточной поверхности проводили в реакции прямой иммунофлуоресценции. 1×10^5 клеток трижды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) pH 7,5 и ресуспендировали в PBS. В каждую пробирку с клетками добавляли моноклональные антитела к CD71, меченные FITC, и инкубировали в течение 30 мин при 4 °С. По истечении срока инкубации клетки дважды промывали PBS от несвязавшихся антител и ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащего 1 % формалин. Экспрессию CD71 оценивали на проточном цитофлуориметре ACEA NovoCyte 2000R (Acea Bioscience, США). В каждой пробе анализировали до 10 тыс. событий. Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеивания и размера клеток. Для определения экспрессии ферритина вводилась дополнительная процедура — пермеабиллизация клеток. Пермеабиллизацию проводили, используя PBS с 0,1 % Triton X-100 в течение 10 мин, далее клетки дважды промывали центрифугированием и ресуспендировали в 0,1 мл PBS.

Исследование влияния CD437 на индукцию ферроптоза *in vitro*. Клетки Mel Z растили в полной среде RPMI-1640 в 24-луночной планшете. Через 24 ч роста клеток в CO₂-инкубаторе при 37 °С добавляли 10,0 мкМ эрастина или 1,0 мкМ CD437 и инкубировали в течение 5 ч. В качестве контроля использовали клетки, растущие в полной среде RPMI-1640 без индуктора ферроптоза. Затем среду заменяли свежей, не содержащей сыворотки, и добавляли 5 мкМ C11-BODIPY. Индикатор перекисного окисления липидов C11-BODIPY — это флуорофор, который при переходе из тиоэфира в сульфоксид меняет флуоресцентные характеристики: убывает поглощение красного цвета и нарастает

поглощение зеленого. После инкубации в течение 30 мин с флуоресцентной меткой клетки трижды промывали фосфатным буфером. Интенсивность флуоресценции определяли на флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США) (581/591 нм).

Статистический анализ. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ проведен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, США).

Результаты и обсуждение

Опухолевые клетки перепрограммируют метаболизм железа, увеличивая экспрессию рецептора Tf, CD71, и накапливая ферритин, депонирующий железо, причем иногда в таких количествах (например, в клетках рака молочной железы), что он может играть роль маркера, т.е. с его помощью можно отличать злокачественное поражение молочной железы от доброкачественного [19]. Стабильно воспроизводимая противоопухолевая активность CD437 на моделях ксенотрансплантатов животных, демонстрирующая высокий потенциал для лечения рака, позволила нам поднять вопрос о возможном участии железа в этом эффекте. Мы предположили, что CD437, снижая поступление железа в клетку и увеличивая экспрессию ферритина, мог бы ингибировать репликацию ДНК и предотвратить неконтролируемую пролиферацию опухолевых клеток.

Ранее нами при инкубации клеток Mel Z с CD437 в диапазоне концентраций от 0,001 до 1 мМ была определена нецитотоксическая концентрация (IC₁₀) CD437, составившая 1 мкМ [10]. Влияние CD437 на экспрессию CD71 и ферритина исследовали при инкубации клеток с нецитотоксическими концентрациями CD437 (1 мкМ). Такая схема эксперимента позволяла исключить вклад цитотоксичности CD437 в этот процесс. CD71 экспрессировали 40 ± 4 % клеток ($p < 0,05$) в контроле, а при инкубации с CD437 количество клеток, экспрессирующих этот маркер, возрастало до 80 ± 6 % ($p < 0,05$) (рис. 1, а). На следующем этапе работы мы исследовали влияние CD437 на экспрессию ферритина. Мы ожидали, что двукратное повышение захвата железа клетками меланомы должно сопровождаться активацией экспрессии ферритина, депонирующего несвязанное железо. В контрольных экспериментах ферритин экспрессировали 84 ± 6 % клеток ($p < 0,05$). При инкубации с CD437 ферритин стали экспрессировать все клетки (100 %, $p < 0,05$) (рис. 1, б).

Подобный сценарий указывает на то, что CD437, по всей видимости, способствует накоплению в клетке свободного железа. Присутствие в клетке железа в свободном состоянии запускает реакцию Фентона

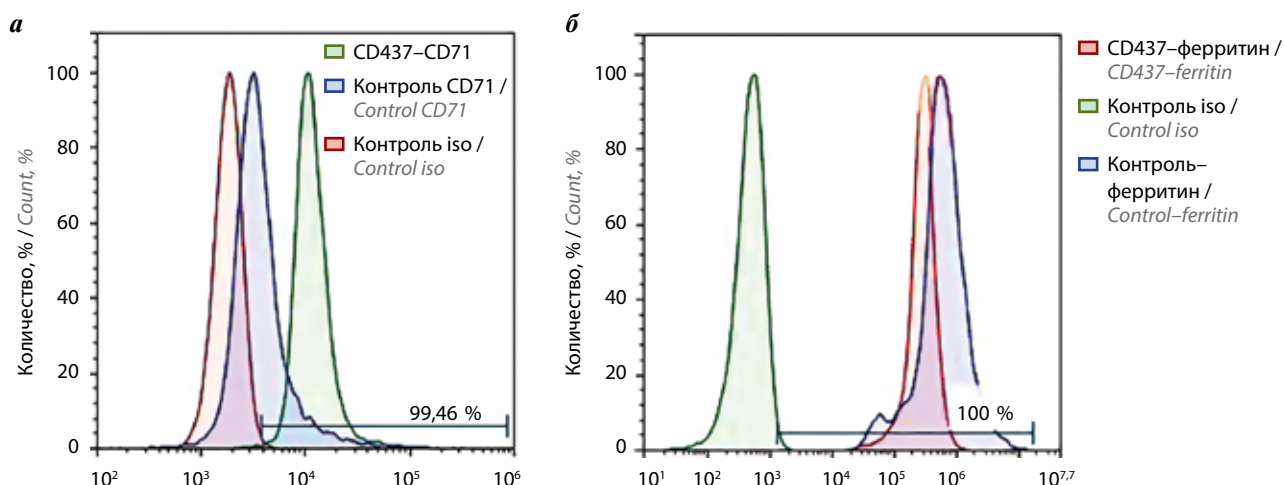


Рис. 1. Влияние CD437 на экспрессию CD71 (а) и ферритина (б) клетками Mel Z после 24 ч инкубации

Fig. 1. The influence of CD437 on CD71 (a) and ferritin (б) expression in Mel Z cells after 24 h incubation

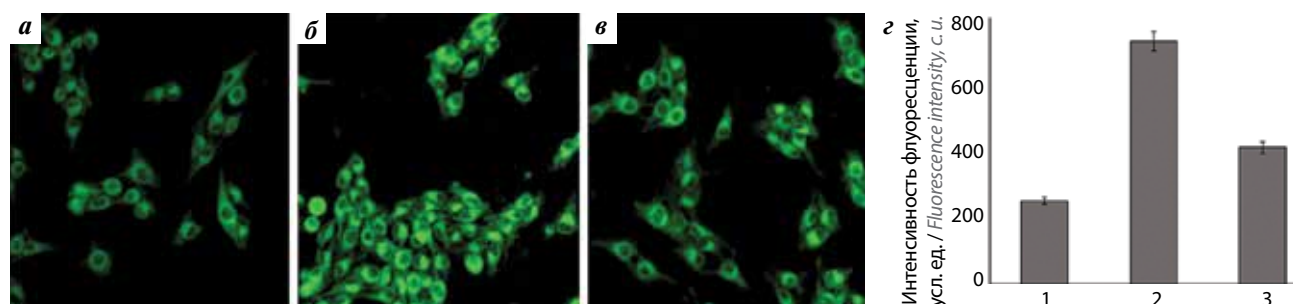


Рис. 2. Влияние CD437 на индукцию ферроптоза в Mel Z клетках. Флуоресценция C11-BODIPY в клетках Mel Z: а – контрольные клетки, без добавления CD437; б – клетки с 10,0 мкМ эрастина; в – клетки с 1,0 мкМ CD437; г – уровень перекисного окисления липидов в клетках Mel Z: 1 – интенсивность флуоресценции в контрольных клетках, без добавления CD437; 2 – индуцированная эрастином; 3 – индуцированная CD437. $\times 200$

Fig. 2. The influence of CD437 on ferroptosis induction in Mel Z cells. The fluorescence of C11-BODIPY in Mel Z: а – control cells, without addition of CD437; б – cells grown with 10.0 μ M erastin; в – cells grown with 1.0 μ M of CD437: 1 – fluorescence intensity of control cells, without CD437 addition; 2 – after 24 h incubation with erastin; 3 – after 24 h incubation with CD437. $\times 200$

и увеличивает уровень активных форм кислорода. Ферроптоз сегодня рассматривается как железозависимая регулируемая гибель клетки. Гибель клетки по типу ферроптоза базируется на перекисном окислении липидов мембран, которое сопровождается появлением многочисленных пор в плазматической мембране. Содержимое клетки вытекает в межклеточную среду, клетка уменьшается в размерах, сморщивается. Процесс этот абсолютно одинаков для всех типов клеток [23]. К бесконтрольному перекисному окислению липидов клеточных мембран приводят отказ механизмов антиоксидантной защиты клетки и дисбаланс клеточных метаболических процессов (например, метаболизма липидов и кратковременного повышения уровня железа) [24].

В наших исследованиях о роли CD437 в гибели клеток по типу ферроптоза в качестве положительного контроля мы использовали эрастин. Эрастин, исторически первый индуктор ферроптоза, и сегодня

продолжает оставаться «золотым стандартом». Ранее нами были протестированы 0,1 мкМ, 1,0 мкМ и 10 мкМ эрастина на способность индуцировать ферроптоз в клетках меланомы Mel Z. Массовая гибель клеток наблюдалась при 10 мкМ эрастина. 10 мкМ эрастина не вызывало фрагментацию ядра, что является итогом активации апоптоза. На гибель клеток, индуцированную эрастином, не оказывало влияния и присутствие 20 мкМ хлорокина, ингибитора аутофагии [25]. О гибели клеток Mel Z по типу ферроптоза судили по интенсивности перекисного окисления липидов, которое фиксировали после инкубации клеток с флуоресцентной меткой C11-BODIPY. Для исключения индукции апоптоза и/или некроза CD437 в клетках Mel Z мы использовали нецитотоксические концентрации CD437. В контрольных экспериментах без добавления CD437 уровень перекисного окисления липидов был незначительным (рис. 2, а). Перекисное окисление липидов мембран, индуцированное 1 мкМ CD437,

составляло $55 \pm 5 \%$ ($p < 0,05$) от интенсивности флуоресценции положительного контроля, 10 мкМ эрастина (рис. 2, б–г). В клетках, инкубированных с эквимоллярным количеством диметилсульфоксида, интенсивность флуоресценции была невысокой и равнялась значениям интенсивности флуоресценции контрольных клеток (данные не приводятся). Низкий уровень перекисного окисления липидов мембран Mel Z в ответ на CD437 не позволяет рассматривать его как индуктор ферроптоза в клетках метастатической меланомы.

Железо используется клеткой для включения в гем или кофакторы ферментов. Не участвующее в метаболизме железо клетки депонируется в составе ферритина. В отношении локализации свободного, не связанного с ферритином железа в клетках в настоящее время имеется лишь ограниченное число данных. Предполагают, что существуют небольшие

клеточные лабильные пулы железа, и с таким пулом связывают токсичность железа для клетки. По всей видимости, CD437, повышая захват железа клетками метастатической меланомы, пополняет лабильные пулы свободного железа. Наблюдаемое нами повышение захвата железа клетками метастатической меланомы позволяет поднять вопрос об инициации дополнительных исследований для поиска не идентифицированных ранее мишеней связывания железа.

Заключение

CD437 повышает захват железа клетками метастатической меланомы. Низкий уровень перекисного окисления липидов мембран, индуцированного CD437, не позволяет рассматривать его как индуктор ферроптоза. Нужны дополнительные исследования для поиска мишеней, связывающих железо, альтернативных ферритину.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Alvarez S., Bourguet W., Gronemeyer H., de Lera A.R. Retinoic acid receptor modulators: a perspective on recent advances and promises. *Expert Opin Ther Pat* 2011;21(1):55–63. DOI: 10.1517/13543776.2011.536531
- Han T., Goralski M., Capota E. et al. The antitumor toxin CD437 is a direct inhibitor of DNA polymerase α . *Nat Chem Biol* 2016;12(7):511–5. DOI: 10.1038/nchembio.2082
- di Masi A., Leboffe L., De Marinis E. et al. Retinoic acid receptors: from molecular mechanisms to cancer therapy. *Mol Aspects Med* 2015;41:1–115. DOI: 10.1016/j.mam.2014.12.003
- Langdon S.P., Rabiasz G.J., Ritchie A.A. et al. Growth-inhibitory effects of the synthetic retinoid CD437 against ovarian carcinoma models *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;42(5):429–32. DOI: 10.1007/s002800050841
- Doldo E., Costanza G., Agostinelli S. et al. Vitamin A, cancer treatment and prevention: the new role of cellular retinol binding proteins. *Biomed Res Int* 2015;2015:624627. DOI: 10.1155/2015/624627
- Shyu R.Y., Lin D.Y., Reichert U., Jiang S.Y. Synthetic retinoid CD437 induces cell dependent cycle arrest by differential regulation of cell cycle associated proteins. *Anticancer Res* 2002;22(5):2757–64. PMID: 12529993.
- Zhao X., Demary K., Wong L. et al. C. Retinoic acid receptor-independent mechanism of apoptosis of melanoma cells by the retinoid CD437 (AHPN). *Cell Death Differ* 2001;8(9):878–86. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400894
- Zhao X., Spanjaard R.A. The apoptotic action of the retinoid CD437/AHPN: diverse effects, common basis. *J Biomed Sci* 2003;10(1):44–50. DOI: 10.1007/BF02255996
- Lotan R. Receptor-independent induction of apoptosis by synthetic retinoids. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003;17(1):13–28. PMID: 12757019
- Вартанян А.А., Хоченкова Ю.А., Кособокова Е.Н и др. CD437 снижает метастатический потенциал клеток меланомы. *Вестник Московского Университета. Серия 2: Химия* 2021;62(4):10–7. Vartanian A.A., Khochenkova Yu.A., Kosobokova E.N. et al. CD437 reduces metastatic potential of melanoma cells. *Vestnik Moscovskogo Universiteta. Seriya 2: Himiya = Moscow University Chemistry Bulletin* 2021;62(4):10–7. (In Russ.).
- Ludwig H., Evstatiev R., Kornek G. et al. Iron metabolism and iron supplementation in cancer patients. *Wien Klin Wochenschr* 2015;127(23–24):907–19. DOI: 10.1007/s00508-015-0842-3
- Gozzelino R., Arosio P. Iron homeostasis in health and disease. *Int J Mol Sci* 2016;17(1):E130–E8. DOI: 10.3390/ijms17010130
- Zhang D.L., Ghosh M.C., Rouault T.A. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis – an update. *Front Pharmacol* 2014;5:124–9. DOI: 10.3389/fphar.2014.00124
- Jozwiakowski S.K., Kummer S., Gari K. Human DNA polymerase delta requires an iron-sulfur cluster for high-fidelity DNA synthesis. *Life Sci Alliance* 2019;2(4):e201900321. DOI: 10.26508/lsa.201900321
- Kleingardner J.G., Bren K.L. Biological significance and applications of heme proteins and peptides. *Acc Chem Res* 2015;48(7):1845–52. DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00106
- Paul B.T., Manz D.H., Torti F.M., Torti S.V. Mitochondria and iron: current questions. *Expert Rev Hematol* 2017;10(1):65–79. DOI: 10.1080/17474086.2016.1268047
- Shen Y., Li X., Dong D. et al. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. *Am J Cancer Res* 2018;8(6):916–31. PMID: 30034931
- Habashy H.O., Powe D.G., Staka C.M. et al. Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119(2):283–93. DOI: 10.1007/s10549-009-0345-x
- Bitonto V., Alberti D., Ruii R. et al. L-ferritin: a theranostic agent of natural origin for MRI visualization and treatment of breast cancer. *J Control Release* 2020;319:300–10. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.12.051
- Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149(5):1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042
- Damsky W.E., Theodosakis N., Bosenberg M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene* 2014;33(19):2413–18. DOI: 10.1038/ncr.2013.194
- Simon A., Kourie H.R., Kerger J. Is there still a role for cytotoxic chemotherapy after targeted therapy and immunotherapy in metastatic melanoma? A case report and literature review. *Chin J Cancer* 2017;36(1):10. DOI: 10.1186/s40880-017-0179-6

23. Li J., Cao F., Yin H.L. et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020;11(2):88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2
24. Yang W.S., Stockwell B.R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol* 2016;26(3):165–76. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.10.014
25. Вартанян А.А., Осипов В.Н., Хоченков Д.А. и др. Производные хиназолина, индуцирующие ферроптоз в метастатических клетках меланомы и рака толстой кишки. Патент на изобретение RU 2722308 C1, 2020. Vartanian A.A., Osipov V.N., Khochenkov D.A. et al. Quinazoline derivatives inducing ferroptosis in metastatic melanoma cells and colon cancer. Patent of Invention RU 2722308 C1, 2020. (In Russ.)

Благодарности

Авторы благодарят М.А. Барышникову и Д.А. Хоченкова за помощь в обсуждении результатов.

Acknowledgments

The authors thank M. Baryshnikova and D. Khochenkov for valuable comments and critical reading the manuscript.

Вклад авторов

А.А. Вартанян: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка данных, подготовка рукописи;
Ю.А. Хоченкова: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования на проточном флуориметре;
В.С. Косоруков: анализ и интерпретация данных.

Author's contribution

A.A. Vartanian: developing the concept and design of the research, data collection and processing, preparation of the manuscript;
Yu.A. Khochenkova: data collection and processing, providing research materials on Flow Cytometry;
V.S. Kosorukov: data analysis and interpretation.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Вартанян / A.A. Vartanian: <https://orcid.org/0000-0001-9342-5523>
Ю.А. Хоченкова / Yu.A. Khochenkova: <https://orcid.org/0000-0001-8392-5495>
В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИОКТР № АААА-А20-120031190017-7 «Разработка и доклиническое исследование лекарственного средства BEL400, предназначенного для терапии опухолей».

Funding. This work was carried out with the financial support of experimental scientific development program № АААА-А20-120031190017-7 “Development and preclinical study of the drug BEL400 for tumor therapy”.

Статья поступила: 16.08.2022. Принята к публикации: 19.09.2022.

Article submitted: 16.08.2022. Accepted for publication: 19.09.2022.

Исследование биосовместимости *in vitro* ультрамелкозернистых биорезорбируемых сплавов на основе Zn

Н.С. Мартыненко¹, Н.Ю. Анисимова¹⁻³, М.В. Киселевский^{2,3}, О.В. Рыбальченко¹, Д.Р. Темралиева^{1,3}, Д.В. Просвирнин¹, С.В. Пивоварчик¹, Д.В. Филоненко⁴, С.В. Добаткин^{1,3}

¹ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН»; Россия, 119334 Москва, Ленинский пр-т, 49;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-т, 4;

⁴отдел общей онкологии ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86

Контакты: Наталья Сергеевна Мартыненко nataliasmartynenko@gmail.com

Введение. В сравнении с магниевыми сплавами сплавы на основе цинка обладают преимуществами при использовании в качестве биodeградируемых имплантируемых ортопедических металлоконструкций за счет отсутствия газообразования, однако уступают по механическим свойствам.

Цель исследования – изучить влияние обработки методом кручения под высоким давлением (КВД) на прочность, пластичность, коррозионную стойкость, антимикробные свойства, поверхностную колонизацию клетками и биосовместимость сплавов на основе цинка.

Материалы и методы. В работе были исследованы сплавы системы Zn-x%Mg (где x = 0; 1 и 1,7 %) в исходном недеформированном состоянии и после КВД. Механические свойства исследовали на испытательной машине Instron 3382 при комнатной температуре. Биосовместимость сплавов оценивали по гемолитической активности и цитотоксичности. Кроме того, исследовали стимуляцию колонизации мезенхимальными мультиметными стромальными клетками поверхности образцов, а также наличие антимикробных свойств в отношении культуры *Escherichia coli*. Для изучения скорости деградации образцы сплавов инкубировали в стандартной питательной среде в течение 8 сут, оценивая изменение их массы относительно исходного значения.

Результаты. Установлено, что КВД приводит к росту прочности чистого цинка в 2 раза, а сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg – в 3 и 5,5 раза соответственно, при увеличении их пластичности. При этом деформационная обработка практически не влияет на коррозионную стойкость исходных материалов. В ходе проведенных исследований не выявлено достоверного увеличения гемолитической активности и бактерицидности сплавов. Однако наблюдали достоверное снижение способности клеток к колонизации поверхности чистого цинка после КВД.

Заключение. КВД приводит к существенному росту прочности изученных материалов при одновременном увеличении их пластичности. При этом проведенные исследования не показали достоверного ухудшения биосовместимости сплавов на основе цинка после КВД. Можно предположить, что выявленный цитотоксический эффект, очевидно, был опосредован не столько методом обработки сплава, сколько его химическим составом. Это позволяет оценить обработанные КВД исследованные сплавы системы Zn-x%Mg (и в частности, сплав Zn-1,7%Mg) как перспективную основу для разработки биodeградируемых ортопедических медицинских изделий.

Ключевые слова: цинковые сплавы, имплантат, биodeградация, биосовместимость, антимикробные свойства

Для цитирования: Мартыненко Н.С., Анисимова Н.Ю., Киселевский М.В. и др. Исследование биосовместимости *in vitro* ультрамелкозернистых биорезорбируемых сплавов на основе Zn. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):40–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-40-49

Study of biocompatibility *in vitro* of ultrafine-grained Zn-based bioresorbable alloys

Natalia S. Martynenko¹, Natalia Yu. Anisimova¹⁻³, Mikhail V. Kiselevskiy^{2,3}, Olga V. Rybalchenko¹, Diana R. Temralieva^{1,3}, Dmitry V. Prosvirnin¹, Svetlana V. Pivovarchik¹, Dmitrii V. Filonenko⁴, Sergey V. Dobatkin^{1,3}

¹A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences; 49 Leninsky Ave., Moscow 119334, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

³National University of Science and Technology «MISIS»; 4 Leninsky Ave., Moscow 119991, Russia;

⁴General Oncology Department of the A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; 86 Entuziastov Shosse, Moscow 111123, Russia

Contacts: Natalia Sergeevna Martynenko nataliasmartynenko@gmail.com

Background. Zinc alloys have advantages for use as biodegradable implantable orthopedic metal structures due to the absence of gas formation in comparison with magnesium alloys. But their mechanical properties are often has lower values.

Aim. Investigation of effect of high-pressure torsion (HPT) on strength, ductility, corrosion resistance, antimicrobial properties, surface cell colonization and biocompatibility of Zn-based alloys.

Materials and methods. The alloys of the Zn-x%Mg system (where x = 0; 1 and 1.7 %) in the initial undeformed state and after HPT were investigated in this work. Mechanical properties were studied on an Instron 3382 testing machine at room temperature. The biocompatibility of the alloys was evaluated by hemolytic activity and cytotoxicity assesment. We also studied the stimulation of colonization of the surface of the samples by mesenchymal multipotent stromal cells, as well as the presence of antimicrobial properties relative to the *Escherichia coli* culture. To study the degradation rate, the alloy samples were incubated in a standard nutrient medium for 8 days, assessing the change in their mass relative to the initial value.

Results. It has been established that HPT leads to an increase in the strength of pure Zn 2 times, and of Zn-1%Mg and Zn-1.7%Mg alloys by 3 and 5.5 times, respectively, with an increase in their ductility. At the same time, deformation treatment has practically no effect on the corrosion resistance of the initial materials. No significant increase in the hemolytic activity and bactericidal activity of the alloys was revealed during studies. However, a significant decrease in the ability of cells to colonize the surface of pure zinc was observed after HPT.

Conclusion. HPT leads to a significant increase in the strength and ductility of studied materials. At the same time, a decrease in the biocompatibility of zinc-based alloys after HPT did not observed. It was found that the discovered cytotoxic effect was obviously caused not so much by the alloy processing method as by its chemical composition. This makes it possible to evaluate the studied alloys of the Zn-x%Mg system treated by HPT (and, in particular, the Zn-1.7%Mg alloy) as a promising structure for the development of biodegradable orthopedic products.

Keywords: zinc alloys, bioresorption, biodegradation, biocompatibility, antimicrobial properties

For citation: Martynenko N.S., Anisimova N.Yu., Kiselevskiy M.V. et al. Study of biocompatibility *in vitro* of ultra-fine-grained Zn-based bioresorbable alloys. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(3):40–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-40-49

Введение

Повреждение костной ткани, включая оскольчатые и компрессионные переломы, является одним из наиболее распространенных видов травм. В подавляющем большинстве случаев такие травмы приводят к снижению запаса прочности кости и нарушению ее опорной функции. Для того чтобы не снижалось качество жизни пациентов с такими травмами, часто требуется временная реконструкция костных структур с помощью винтов, пластин, скоб и т. п. В настоящее время для данных целей чаще всего используют биоинертные титан и сплавы на его основе, а также коррозионностойкую сталь [1–3]. Данные материалы обладают высокими прочностными характеристиками и могут успешно выполнять функцию временного костного каркаса. Однако большим недостатком является то, что их прочность существенно превышает прочность кортикальной кости, что может приводить к ее повреждению имплантатом за счет так называемого эффекта «экранирования напряжений»

[4]. Это существенно повышает риск повторного перелома кости в области крепления имплантата. Кроме того, биоинертные имплантаты необходимо удалять после заживления перелома, что приводит к повторной травматизации костной и окружающих тканей и увеличению времени реабилитации пациента. Поэтому в последние два десятилетия интерес исследователей и врачей-специалистов направлен на разработку материалов нового поколения для остеосинтеза — биodeградируемых изделий (имплантатов, металлоконструкций и остеофиксаторов) [5–6]. Такие имплантаты могут постепенно резорбироваться в организме пациента, перенося нагрузку на кость. Кроме того, благодаря постепенной деградации таких имплантатов отпадает потребность в проведении повторной операции, что способствует скорейшему выздоровлению пациента. Долгое время основными кандидатами на роль материалов для создания металлических биоразлагаемых имплантатов являлись магний и сплавы на его основе [7–8]. Они обладают

приемлемым уровнем биосовместимости и прочностными характеристиками, сходными с характеристиками костной ткани. Однако основным недостатком магниевых сплавов является довольно высокая скорость их деградации, из-за чего имплантат может выйти из строя быстрее, чем произойдет полное заживление кости. Кроме того, деградация магниевых сплавов сопровождается выделением газообразного водорода, что может приводить к образованию в тканях газовых пузырей и ухудшать адгезию клеток на поверхности изделия. А.С. Hänzi и соавт. [9] показали, что при имплантации образцов сплава Mg–Y–Zn карликовым свиньям в печень и малый сальник наблюдалось ограниченное газообразование, тогда как введение образца сплава в прямую мышцу живота приводило к существенному скоплению водорода в области имплантации. N. Anisimova и соавт. [10] также наблюдали активное газовыделение с образованием воздушных карманов при деградации сплавов Mg-6%Ag и Mg-10%Gd *in vivo*. Поэтому, несмотря на преимущества, магниевые сплавы не всегда могут быть применимы в остеосинтезе.

В отличие от быстрорастворяющихся магниевых сплавов, цинк и сплавы на его основе демонстрируют более подходящую скорость деградации без выделения избыточного водорода [11–13]. В настоящее время большое внимание уделяется исследованиям, направленным на изучение влияния состава цинковых сплавов на их прочностные и коррозионные свойства, а также биосовместимость. Ранее было показано, что имплантация штифтов из чистого цинка в ткани прямой кишки мышей не вызывает серьезных побочных эффектов. Также было обнаружено, что чистый цинк ингибирует острое воспаление за счет повышенной экспрессии ENA-78 и F4/80 [14]. Исследование биосовместимости сплавов Zn-0,05%Mg-x%Ag *in vivo* при имплантации в искусственно сформированный дефект дистального отдела бедренной кости кроликов также не показало очевидной токсичности сплава в течение 24-недельного периода имплантации [15]. Интересно, что чистый цинк и сплав Zn-0,05%Mg показали сильную антибактериальную активность в отношении *Escherichia coli* (*E. coli*) и *Staphylococcus aureus* [16]. Однако в случае сплава Zn–Mg–Fe (98 масс. % $\leq$ Zn $\leq$ 99,5 масс. %; 0,01 масс. % $\leq$ Mg $\leq$ 0,5 масс. % и 0,01 масс. % $\leq$ Fe $\leq$ 0,5 масс. %) наблюдалось накопление цинка в прилегающих к кости тканях при хорошей биосовместимости *in vivo* [17]. При этом, несмотря на приведенные результаты, накопленная статистика по исследованию биосовместимости сплавов на основе цинка все еще остается довольно скудной и противоречивой. Поэтому исследование влияния цинка и его сплавов на различные аспекты биосовместимости в настоящее время является актуальной задачей.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении биосовместимости сплавов системы Zn–Mg (0; 1 и 1,7 % Mg) в исходном (крупнозернистом) и упрочненном методом кручения под высоким давлением (КВД) состояниях. Применение КВД позволяет существенно повысить прочность цинковых сплавов за счет сильного измельчения их микроструктуры [18–20], что является очередным шагом на пути к разработке конечного медицинского изделия.

Материалы и методы

Материалы исследования. В настоящей работе в качестве материалов исследования были выбраны чистый цинк и 2 сплава с номинальным составом Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg в исходном, крупнозернистом (отжиг) и мелкозернистом (упрочненном КВД) состояниях. Химический состав изучаемых материалов представлен в табл. 1. Деформацию чистого цинка проводили из литого состояния. Сплавы Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg перед деформацией подвергали гомогенизационному отжигу при 340 °С в течение 20 ч (охлаждение водой) для выравнивания химического состава сплавов. КВД проводили на дисках диаметром 20 мм и толщиной 1,5 мм при комнатной температуре под давлением 4 ГПа ($n = 10$).

Таблица 1. Химический состав изучаемых материалов
Table 1. Chemical composition of materials

Сплав Alloy	Zn, масс. % Zn, wt. %	Mg, масс. % Mg, wt. %
Zn	Основа Balance	—
Zn-1%Mg	Основа Balance	0,98 $\pm$ 0,03
Zn-1,7%Mg	Основа Balance	1,73 $\pm$ 0,05

Исследование механических свойств. Механические характеристики исследуемых материалов определяли на испытательной машине Instron 3382 со скоростью растяжения 1 мм/мин при комнатной температуре. Испытания проводили на плоских образцах с площадью поперечного сечения 2 мм $\times$ 1 мм и рабочей длиной 5,75 мм.

Подготовка образцов к исследованию биологических свойств. Для исследований использовали образцы в форме 1/8 диска диаметром 20 мм и толщиной около 1 мм ($n = 12$). Перед началом проведения исследований образцы погружали на 24 часа в 70 % этанол, а затем сушили в стерильных условиях.

Гемолитическая активность и цитотоксичность образцов сплавов *in vitro*. Выделение клеток для получения биологических моделей и исследования указанных

параметров проводили в соответствии с описанными ранее методиками [21]. В качестве биологических моделей для изучения указанных параметров использовали эритроциты ($3 \pm 0,2 \times 10^7$ клеток/мл) и мононуклеарные лейкоциты крови мышей линии C57BL/6 ($6 \pm 0,12 \times 10^5$ клеток/мл), суспендированные в физиологическом растворе хлорида натрия («ПанЭко», Россия) или в питательной среде на основе Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) («ПанЭко», Россия), дополненной 5 % фетальной бычьей сыворотки (Hyclone, США), 2 мМ глутамина («ПанЭко», Россия), 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина («ПанЭко», Россия) соответственно. В качестве контроля использовали суспензии клеток, которые инкубировали без образцов сплавов в аналогичных условиях. Индуцированный гемолиз оценивали через 4 ч, а цитотоксичность через 24 ч после начала коинкубации сплавов и клеточных суспензий при 37 °С в атмосфере 5 % углекислого газа согласно методике. Для оценки цитотоксичности исследовали активность лактатдегидрогеназы с использованием наборов реактивов Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с методикой производителя, измеряя адсорбцию при 450 нм против 620 нм на планшетном ридере Spark (Tecan, США). Гемолитическую активность оценивали, учитывая адсорбцию супернатанта при 540 нм (A540). Результат исследований был представлен как отношение измеренной адсорбции к контролю (% относительно контроля).

Исследование стимуляции клеточной колонизации. Для проведения данного исследования использовали мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), генерированные из костного мозга мышей в соответствии с ранее описанной методикой [22]. 12 000 клеток в объеме 20 мкл наносили в виде капли в центр образцов сплавов на дне лунок планшета для инкубации, выдерживали 30 мин, а затем осторожно вносили в лунку основной объем культивационной питательной среды. В контроле клетки инкубировали при аналогичных условиях, но без сплавов. Через 8 сут проводили учет результатов. Для регистрации клеточной активности на образцах сплавов использовали тест на лактатдегидрогеназу, измеряя адсорбцию при 450 нм на фоне 620 нм (A450 – A620).

Антибактериальные свойства исследуемых образцов сплавов оценивали на модели 20-часовой культуры *E. coli* (коллекция ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) после 24 ч инкубации в бульоне Мюллера–Хинтона при 37 °С в атмосфере 5 % углекислого газа. В контроле бактериальную культуру инкубировали без сплавов в таких же условиях. Для учета результатов использовали индикатор Alamar blue (Invitrogen, США) в соответствии

с инструкцией производителя с последующей регистрацией флуоресценции на планшетном ридере Spark (Tecan, США) при Ex530/Em590.

Все манипуляции и исследования были одобрены местным комитетом по этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (шифр темы AAA-A19-119061190077, протокол № 2 от 12.05.2019).

Исследование коррозионной стойкости. Исследования скорости деградации материалов проводили иммерсионным методом путем погружения образцов в питательную среду на основе DMEM. Испытания проводились при температуре 37 °С в течение 8 сут. Для каждого сплава исследование проводили на 3 образцах одного типа, предварительно обработанных погружением в этанол. Для удаления продуктов деградации образцы промывались в 10 % водном растворе персульфата аммония ((NH₄)₂S₂O₈) в течение 5 мин [23]. После удаления продуктов деградации образцы тщательно высушивали на воздухе и взвешивали на электронных весах Sartorius pro 11 (с точностью до 3 знаков на 1 мг). Значение скорости деградации рассчитывали по формуле [23]:

$$DR = 8,76 \times 10^4 \times \frac{m_0 - m_f}{A \times t \times \rho},$$

где DR – скорость деградации, мм/год; m_0 – исходная масса, г; m_f – конечная масса, г; t – время погружения, ч; A – площадь поверхности образца, см²; ρ – плотность сплава, г/см³.

Потерю массы рассчитывали по формуле:

$$ML = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \times 100,$$

где ML – потеря массы, %; m_0 – исходная масса, г; m_f – конечная масса, г.

Статистический анализ данных. Результаты представлены в виде среднего значения и стандартной девиации учтенных в триплетах величин. Сравнительный анализ межгрупповых данных проводили с использованием t-критерия. Для оценки полученных результатов сравнивали активность сплавов после КВД с исходным образцом, а также с контролем, содержащим клетки, которые инкубировали в сходных условиях без сплавов. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Механические свойства. В табл. 2 представлены результаты исследования механических свойств сплавов до и после КВД.

Таблица 2. Механические свойства изучаемых материалов до и после кручения под высоким давлением (КВД)

Table 2. Mechanical properties of materials before and after high-pressure torsion (HPT)

Материал и его обработка Material and its processing		Предел текучести, МПа Yield stress, MPa	Предел прочности, МПа Ultimate tensile strength, MPa	Удлинение, % Elongation, %
Zn	Отжиг Annealing	67 ± 4	89 ± 6	5,0 ± 1,0
	КВД HPT	204 ± 30	260 ± 21	58,1 ± 21,1
Zn-1%Mg	Отжиг Annealing	153 ± 7	156 ± 3	0,2 ± 0,1
	КВД HPT	374 ± 5	459 ± 25	6,3 ± 3,3
Zn-1,7%Mg	Отжиг Annealing	47 ± 11	75 ± 14	0,3 ± 0,02
	КВД HPT	344 ± 2	411 ± 1	55,3 ± 22,3

Видно, что КВД приводит к существенному росту прочности изучаемых материалов. Так, прочность чистого цинка повысилась с 89 ± 6 МПа в исходном состоянии до 260 ± 21 МПа после КВД при увеличении пластичности с $5,0 \pm 1,0$ до $58,1 \pm 21,1$ %. В случае сплава Zn-1%Mg наблюдается рост прочности со 156 ± 3 до 459 ± 25 МПа при небольшом увеличении пластичности с $0,2 \pm 0,1$ до $6,3 \pm 3,3$ %. Наибольший прирост прочности наблюдается у сплава Zn-1,7%Mg после КВД: с 75 ± 14 до 411 ± 1 МПа при росте пластичности с $0,3 \pm 0,02$ до $55,3 \pm 22,3$ %.

Биосовместимость *in vitro*. Для оценки влияния КВД на биосовместимость сплавов оценивали усиление гемолитической активности и снижение вы-

живаемости лейкоцитов крови после совместной инкубации в сравнении с контролем.

Статистический анализ данных, представленных на рис. 1, показал, что ни один из исследованных сплавов не демонстрирует достоверную гемолитическую активность. Также можно сделать вывод о том, что обработка исходных материалов КВД не влияет на изменение данного параметра биологической активности.

С целью изучения возможного воздействия КВД на другие параметры биосовместимости было исследовано их влияние на выживаемость лейкоцитов после инкубации *in vitro* (рис. 2).

Статистический анализ полученных данных показал, что изменение химического состава и обработки сплавов влияют на проявление их цитотоксичности разнонаправленно. Так, было установлено, что чистый цинк в исходном состоянии достоверно угнетает выживаемость клеток при коинкубации ($p = 0,02$). Однако чистый цинк после КВД не вызывает достоверного снижения жизнеспособности клеток в сравнении с контролем ($p = 0,11$). С другой стороны, исходный сплав Zn-1%Mg не оказывает достоверного цитотоксического воздействия, тогда как после КВД эффект угнетения жизнеспособности лейкоцитов статистически достоверен ($p = 0,03$). Если рассматривать результаты изучения активности образцов сплава Zn-1,7%Mg, то можно отметить, что они в равной степени достоверно проявляют цитотоксичность вне зависимости от обработки: жизнеспособность клеток после инкубации с исходным сплавом Zn-1,7%Mg составляет 69 ± 8 %, со сплавом после КВД — 64 ± 9 %. Достоверность отличий от контроля для сплава в обоих состояниях составляет $p = 0,02$ при отсутствии различий в цитотоксичности сплава до и после КВД ($p = 0,51$).

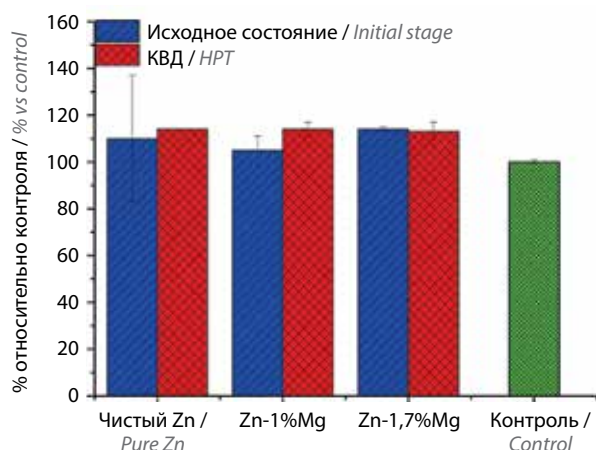


Рис. 1. Гемолитическая активность сплавов на основе цинка до и после КВД в сравнении с контролем. Здесь и на рис. 2–5: КВД – кручение под высоким давлением

Fig. 1. Hemolytic activity of zinc-based alloys before and after HPT in comparison with control. Here and on figures 2–5: HPT – high-pressure torsion

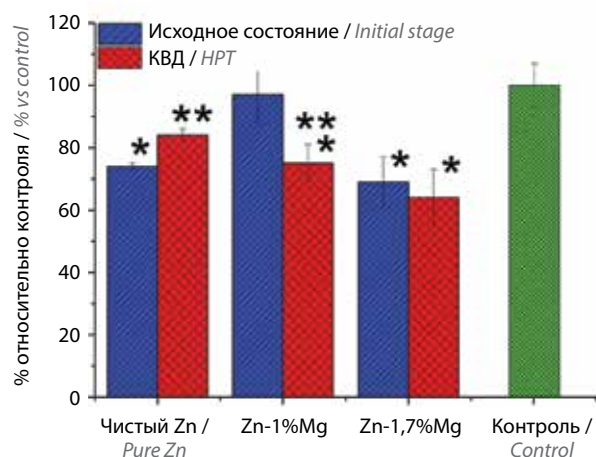


Рис. 2. Влияние сплавов на основе цинка до и после КВД на выживаемость лейкоцитов крови в сравнении с контролем. *Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$; **достоверное отличие от сплава того же состава после обработки КВД, $p < 0,05$

Fig. 2. The effect of zinc-based alloys before and after HPT on the survival of white blood cells in comparison with the control. *Significant difference from the control, $p < 0,05$; **significant difference from the alloy of the same composition after HPT treatment, $p < 0,05$

В целом можно констатировать, что в проведенных исследованиях не установлено достоверного ухудшения биосовместимости сплавов системы Zn-x%Mg после КВД. Можно предположить, что выявленный цитотоксический эффект, очевидно, был опосредован не столько методом обработки сплава, сколько его химическим составом.

Для более углубленной оценки влияния обработки КВД на биологические свойства сплавов исследовали их способность стимулировать колонизацию своей поверхности ММСК, обладающими остеогенным потенциалом, а также оказывать антибактериальный эффект.

Антибактериальный эффект. Известно, что в высоких концентрациях цинк обладает антибактериальными свойствами [16]. Учитывая биорезорбируемость цинксодержащих сплавов, изучаемых в ходе описанного исследования, можно было ожидать, что релиз ионов цинка в среду инкубации сможет обеспечить торможение роста бактериальной культуры или даже оказать бактерицидный эффект. Для проверки этой гипотезы были проведены исследования на тестовой культуре *E. coli* — грамотрицательных микроорганизмов, которые часто опосредуют развитие инфекционных процессов в костных тканях [24].

По результатам проведенных бактериологических исследований не было отмечено замедления роста модельной культуры микроорганизмов, инкубированных в присутствии образцов изучаемых сплавов, в сравнении с контролем, где тестовую культуру микроорганизмов культивировали на дне лунки планшета без образцов ($p = 0,16$) (рис. 3).

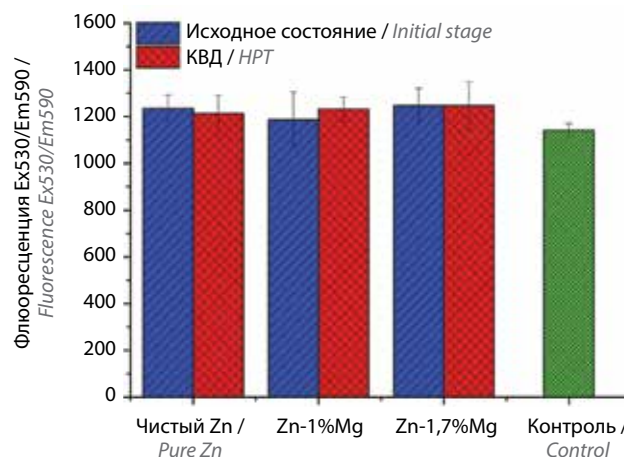


Рис. 3. Рост бактерий *E. coli* в присутствии образцов сплавов на основе цинка

Fig. 3. Growth of *E. coli* bacteria with samples of zinc-based alloys

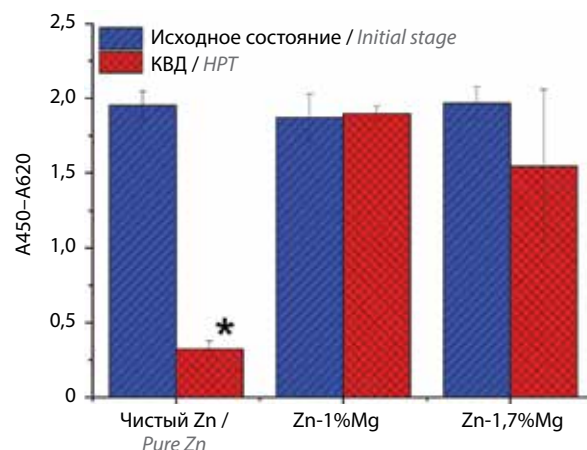


Рис. 4. Стимуляция колонизации поверхности образцов исследуемых материалов остеогенными клетками. A450–A620 — см. пояснение в разделе «Материалы и методы». * $p > 0,05$

Fig. 4. The stimulation of colonization on the surface of studied materials by osteogenic cells. A450–A620 — see explanation in section “Materials and methods”. * $p > 0,05$

Это позволяет сделать вывод об отсутствии у изученных сплавов выраженных антибактериальных свойств. Отдельно следует отметить отсутствие достоверного изменения активности образцов после КВД по сравнению с исходным состоянием. Вероятно, скорость деградации сплавов в данном случае не способна обеспечить достаточное количество ионов Zn^{2+} для достижения антибактериального эффекта.

Стимуляция поверхностной клеточной колонизации. В качестве клеточной модели использовали ММСК — адгезионную культуру клеток, обладающую остеогенным потенциалом.

Данные, представленные на рис. 4, демонстрируют, что КВД способствовало снижению колонизации клетками образцов чистого цинка ($p < 0,001$).

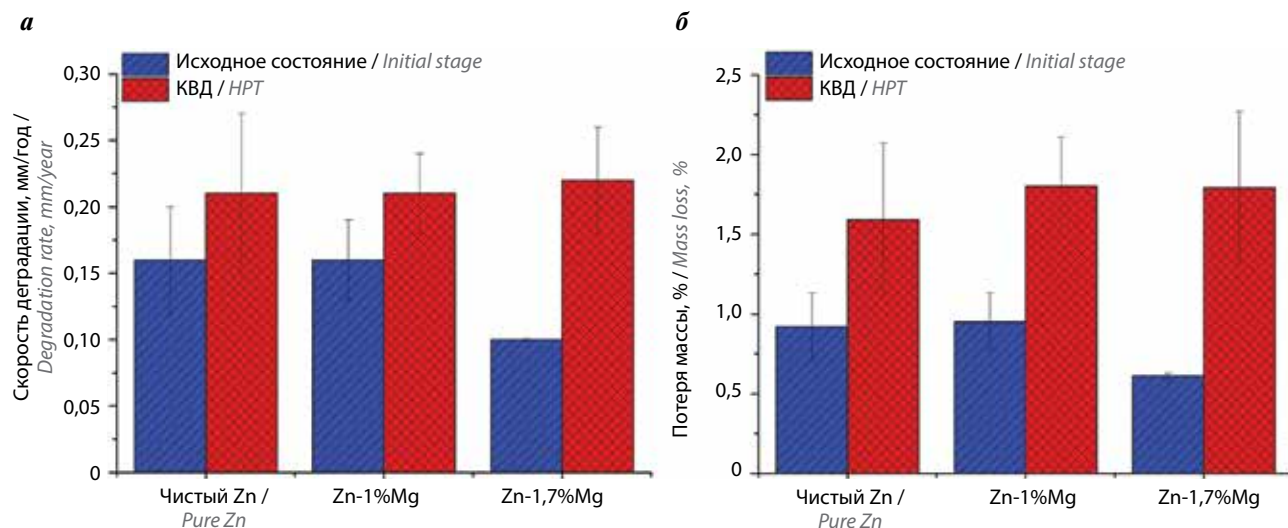


Рис. 5. Скорость деградации (а) и потеря массы (б) исследуемых материалов в исходном состоянии и после КВД

Fig. 5. The degradation rate (a) and the mass loss (б) of the studied materials in the initial state and after HPT

При этом КВД сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg не изменяла учитываемых биоактивных свойств этих сплавов ($p = 0,16$).

Коррозионная стойкость. Одним из наиболее важных эксплуатационных свойств биорезорбируемых сплавов является их коррозионная стойкость. Поэтому важно, чтобы деформационная обработка не приводила к сильному ускорению процесса деградации. В данной работе исследования коррозионной стойкости проводили в условиях, приближенных к условиям эксплуатации готового изделия (37 °C, биоактивная среда с сывороткой крови). Исследования коррозионной стойкости материалов представлены на рис. 5.

Исследования показали, что добавление 1 % магния в чистый цинк не приводит к изменению его коррозионной стойкости. Скорость деградации чистого цинка в исходном состоянии после 8 дней инкубации в растворе на основе среды DMEM составляет $0,16 \pm 0,04$ мм/год, в то время как сплава Zn-1%Mg – $0,16 \pm 0,03$ мм/год. При этом увеличение содержания магния до 1,7 % приводит к снижению скорости деградации до $0,10 \pm 0,00$ мм/год. Потеря массы материалов в исходном состоянии составляет $0,92 \pm 0,21$; $0,95 \pm 0,18$ и $0,61 \pm 0,02$ % для чистого цинка и сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg соответственно. В то же время КВД приводит к небольшому усилению процесса деградации. В случае чистого цинка и сплава Zn-1%Mg рост скорости деградации не превышает погрешности эксперимента, тогда как в случае сплава Zn-1,7%Mg рост скорости деградации превышает экспериментальную ошибку. Скорость деградации сплавов после КВД составляет $0,21 \pm 0,06$; $0,21 \pm 0,03$ и $0,22 \pm 0,04$ мм/год для чистого цинка и сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg соответственно, а потеря массы – $1,59 \pm 0,48$; $1,80 \pm 0,31$ и $1,79 \pm 0,48$ %.

Обсуждение

В последнее время цинк и сплавы на его основе вызывают широкий интерес в качестве материалов медицинского назначения для создания биodeградируемых имплантатов, металлоконструкций и фиксаторов, востребованных в том числе при остеореконструктивных операциях. Это обусловлено удовлетворительной биосовместимостью сплавов цинка, а также их способностью деградировать в тканях организма (они занимают промежуточное положение по скорости биорезорбции между сплавами магния и железа). В сравнении с магниевыми сплавами дополнительным преимуществом сплавов цинка после имплантации является отсутствие газообразования. Однако существенным недостатком исходных сплавов цинка, как уже было показано выше, являются его низкие механические характеристики по сравнению с аналогами. Поэтому в ходе представленного исследования было предложено провести деформационную обработку сплавов цинка различного состава с целью коррекции механических свойств с последующей оценкой биосовместимости и биоактивных свойств полученных образцов. Для этой цели использовали обработку сплавов методом КВД, которое часто применяют для повышения механических свойств сплавов.

Как показали проведенные исследования, КВД значительно улучшает механические свойства сплавов системы Zn-x%Mg. Так, прочность чистого цинка после КВД повышается в 2 раза, тогда как прочность сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg – в 3 и 5,5 раза соответственно. Такой рост прочности обусловлен сильным измельчением микроструктуры изученных материалов. В работе W. Bednarczyk и соавт. [18] было показано, что КВД сплава Zn-0,5%Cu приводит к его существенному упрочнению из-за измельчения

зерна вплоть до ультрамелкозернистого состояния. Схожая ситуация наблюдается и для сплава Zn-0,8%Ag, где измельчение зерна после КВД обеспечивало существенный прирост микротвердости [25]. Следует отметить, что КВД приводит не только к улучшению прочностных свойств изученных материалов, но также существенно повышает их пластичность, что, вероятно, обусловлено двумя факторами. Прежде всего, формированием благоприятного типа текстуры сплавов. В работе К. Ren и соавт. [26] было показано, что измельчение зерна и формирование благоприятной текстуры в сплаве Zn-1%Cu после равноканального углового прессования приводят не только к росту его прочности, но и к увеличению пластичности с 7,3 до 94,2 %. Другой причиной повышения пластичности изученных нами сплавов может быть дробление хрупкой эвтектической фазы Mg_2Zn_{11} . D. Hernández-Escobar и соавт. [20] наблюдали формирование больших (размером около 500 мкм) хрупких кластеров фазы Mg_2Zn_{11} в литом сплаве Zn-3%Mg. Последующее КВД привело к дроблению фазы с образованием более мелких зон, окруженных твердым раствором на основе цинка. Стоит отметить, что рост пластичности существенно расширяет возможности применения сплавов в ортопедии, позволяя изготавливать изделия различной формы и назначения, например скобы для остеосинтеза при переломе ребер.

В опытах *in vitro*, проведенных нами, было показано, что КВД не оказывало однозначного отрицательного воздействия на биосовместимость и биоактивность изучаемых сплавов на основе цинка и магния. В частности, мы не наблюдали достоверного изменения гемолитической активности у сплавов, различающихся как по химическому составу, так и по методу обработки. При этом цитотоксичность в отношении лейкоцитов крови проявлялась у различных образцов вне прямой зависимости от обработки КВД. Также было показано, что этот метод обработки не изменял интенсивность колонизации ММСК поверхности образцов после его применения в сравнении с образцами в исходном состоянии. Однако после КВД чистого цинка мы наблюдали достоверное угнетение стимуляции поверхностной колонизации клетками образцов, что заставляет ограничить вышеприведенный вывод об индифферентности биологических свойств сплавов на основе системы Zn-x%Mg к обработке КВД. В то же время значимое снижение коррозионной стойкости после КВД наблюдается только для сплава Zn-1,7%Mg, для которого не наблюдается существенного ухудшения биосовместимости *in vitro*. Для чистого цинка наблюдается лишь повышение скорости деградации в пределах погрешности эксперимента. Поэтому снижение способности к колонизации ММСК поверхности образцов чистого цинка после КВД не может быть обусловлено только сни-

жением его коррозионной стойкости, а опосредовано, вероятно, химическим составом продуктов деградации сплава, оказывающим на клетки цитопатогенное воздействие, или характером коррозии образца. Ранее в работе С. García-Minteguí и соавт. было показано, что деградация чистого цинка протекает в целом равномерно по всей поверхности исследуемого образца. В то же время в сплавах Zn-0,5%Mg и Zn-1%Mg наблюдалась локализация процесса деградации по границам зерен α -Zn, то есть в местах локализации фазы, богатой магнием [27]. Исходя из этого, можно сделать вывод, что продукты деградации чистого цинка будут богаты ионами Zn^{2+} , тогда как продукты деградации сплавов Zn-1%Mg и Zn-1,7%Mg должны содержать большое количество ионов Mg^{2+} , что стимулирует процесс поверхностной колонизации образцов. Данный вывод подтверждается исследованием S. Retegi-Cargi6n и соавт. [28], в котором было показано, что высвобождение ионов Mg^{2+} в процессе деградации биоразлагаемых мембран на основе полимолочной кислоты (PLA), содержащих магний, способствует улучшению пролиферации ММСК и усиливает остеоиндуктивный потенциал. Схожий эффект был продемонстрирован и в работе D. Li и соавт. [29], где было показано, что экстракты чистого магния и сплавов Mg-3%Zn и Mg-2%Zn-1%Mn, содержащие высокую концентрацию ионов Mg^{2+} , оказывают значительный стимулирующий эффект на остеогенную дифференцировку. Исходя из этого, можно предположить, что легирование чистого цинка магнием может способствовать пролиферации ММСК, а также увеличению остеоиндуктивного потенциала. Однако для подтверждения данной гипотезы, а также для установления приемлемой концентрации магния необходимо проведение дополнительных исследований.

Заключение

Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности разработки способов получения биодеградируемых металлоконструкций на основе сплавов системы Zn-x%Mg (где $x = 0; 1$ и $1,7$ %) методом КВД. Обоснованием данного заключения является то, что в исследовании установлено упрочнение сплавов после КВД. Прочность чистого цинка после КВД увеличивается практически в 2 раза, сплава Zn-1%Mg – в 3 раза, а сплава Zn-1,7%Mg – в 5,5 раза. При этом после КВД также наблюдается рост пластичности исследуемых материалов. В то же время коррозионная стойкость, биосовместимость и биоактивные свойства исходных материалов после КВД практически не изменяются. Исключение составляют только рост скорости деградации сплава Zn-1,7%Mg после КВД, небольшое увеличение цитотоксичности сплава Zn-1%Mg и снижение способности ММСК к колонизации поверхности образцов чистого цинка

после КВД. Полученные результаты могут послужить обоснованием выбора сплавов системы Zn-x%Mg после КВД в качестве основы для погружных биодеградируемых имплантатов, металлоконструкций

и фиксаторов, востребованных в том числе в процессе лечения и реабилитации онкологических больных, предполагающем проведение остеореконструктивных операций.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Коротких Н.Г., Степанов И.В., Ларина О.Е. и др. Применение минипластин из титана с покрытием из наноструктурного гидроксиапатита в комплексном лечении переломов нижней челюсти. Вестник новых медицинских технологий 2011;18(2):356–7. Korotkih N.G., Stepanov I.V., Larina O.E. et al. Application of mini-plates made of titan with nano-structural hydroxiapatite in complex treatment of lower jaw fractures. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Journal of New Medical Technologies 2011;18(2):356–7. (In Russ.).
2. Медведев Ю.А., Шаманаева Л.С., Петрук П.С. и др. Применение имплантатов из тканевого никелида титана для реконструкции нижней стенки глазницы. Стоматология 2014;93(3):35–8. Medvedev Yu.A., Shamanaeva L.S., Petruk P.S. et al. Nickelid titanium mesh for orbital floor reconstruction. Stomatologiya = Stomatology 2014;93(3):35–8. (In Russ.).
3. Xiao F., Zong C., Wang W. et al. Low-temperature fabrication of titania layer on 3D-printed 316L stainless steel for enhancing biocompatibility. Surf Coat Technol 2019;367:91–9. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2019.03.071
4. Pogrel M.A. The concept of stress shielding in nonvascularized bone grafts of the mandible – a review of 2 cases. J Oral Maxillofac Surg 2021;79(1):266.e1–266.e5. DOI: 10.1016/j.joms.2020.09.024
5. Han H.-S., Loffredo S., Jun I. et al. Current status and outlook on the clinical translation of biodegradable metals. Mater Today 2019;23:57–71. DOI: 10.1016/j.mattod.2018.05.018
6. Xia D., Yang F., Zheng Y. et al. Research status of biodegradable metals designed for oral and maxillofacial applications: a review. Bioact Mater 2021;6(11):4186–208. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.01.011
7. Tsakiris V., Tardei C., Clincinschi F.M. Biodegradable Mg alloys for orthopedic implants – a review. J Magnes Alloys 2021;9(6):1884–905. DOI: 10.1016/j.jma.2021.06.024
8. Киселевский М.В., Анисимова Н.Ю., Полоцкий Б.Е. и др. Биоразлагаемые магниевые сплавы – перспективные материалы медицинского назначения (обзор). Современные технологии в медицине 2019;11(3):146–57. DOI: 10.17691/stm2019.11.3.18 Kiselevsky M.V., Anisimova N.Yu., Polotsky B.E. et al. Biodegradable magnesium alloys as promising materials for medical applications (review). Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine 2019;11(3):146–57. (In Russ.). DOI: 10.17691/stm2019.11.3.18
9. Hänzi A.C., Gerber I., Schinhammer M. et al. On the *in vitro* and *in vivo* degradation performance and biological response of new biodegradable Mg–Y–Zn alloys. Acta Biomater 2010;6(5):1824–33. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.10.008
10. Anisimova N., Kiselevskiy M., Martynenko N. et al. Anti-tumour activity of Mg-6%Ag and Mg-10%Gd alloys in mice with inoculated melanoma. Mater Sci Eng C 2021;130:112464. DOI: 10.1016/j.msec.2021.112464
11. Kabir H., Munir K., Wen C., Li Y. Recent research and progress of biodegradable zinc alloys and composites for biomedical applications: biomechanical and biocorrosion perspectives. Bioact Mater 2021;6(3):836–79. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.09.013
12. Venezuella J., Dargusch M.S. The influence of alloying and fabrication techniques on the mechanical properties, biodegradability and biocompatibility of zinc: a comprehensive review. Acta Biomater 2019;87:1–40. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.01.035
13. Li G., Yang H., Zheng Y. et al. Challenges in the use of zinc and its alloys as biodegradable metals: perspective from biomechanical compatibility. Acta Biomater 2019;97:23–45. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.07.038
14. Chen Y., Huang P., Chen H. et al. Assessment of the biocompatibility and biological effects of biodegradable pure zinc material in the colorectum. ACS Biomater Sci Eng 2018;4(12):4095–103. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.8b00957
15. Xiao C., Shi X.Y., Yu W.T. et al. *In vivo* biocompatibility evaluation of Zn-0.05Mg-(0, 0.5, 1wt%)Ag implants in New Zealand rabbits. Mater Sci Eng C 2021;119:111435. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111435
16. Xiao C., Wang L., Ren Y. et al. Indirectly extruded biodegradable Zn-0.05wt%Mg alloy with improved strength and ductility: *in vitro* and *in vivo* studies. J Mater Sci Technol 2018;34(9):1618–27. DOI: 10.1016/j.jmst.2018.01.006
17. Shao X., Wang X., Xu F. et al. *In vivo* biocompatibility and degradability of a Zn–Mg–Fe alloy osteosynthesis system. Bioact Mater 2022;7:154–66. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.05.012
18. Bednarczyk W., Kawałko J., Wątroba M. et al. Microstructure and mechanical properties of a Zn-0.5Cu alloy processed by high-pressure torsion. Mater Sci Eng A 2020;776:139047. DOI: 10.1016/j.msea.2020.139047
19. Srinivasarao B., Zhilyaev A.P., Langdon T.G., Pérez-Prado M.T. On the relation between the microstructure and the mechanical behavior of pure Zn processed by high pressure torsion. Mater Sci Eng A 2013;562:196–202. DOI: 10.1016/j.msea.2012.11.027
20. Hernández-Escobar D., Unocic R.R., Kawasaki M., Boehlert C.J. High-pressure torsion processing of Zn–3Mg alloy and its hybrid counterpart: a comparative study. J Alloys Compd 2020;831:154891. DOI: 10.1016/j.jallcom.2020.154891
21. Rybalchenko O.V., Anisimova N.Yu., Kiselevsky M.V. et al. Effect of equal-channel angular pressing on structure and properties of Fe–Mn–C alloys for biomedical applications. Mater Today Commun 2022;30:103048. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2021.103048
22. Choudhary R., Venkatraman S.K., Bulygina I. et al. Biomineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk. Mater Sci Eng C 2021;118:111456. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111456
23. ASTM G1-03-E. Standard practice for preparing, cleaning, and evaluating corrosion test specimens. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2011.
24. Masters E.A., Ricciardi B.F., Bentley K.L.M. et al. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management. Nat Rev Microbiol 2022;20(7):385–400. DOI: 10.1038/s41579-022-00686-0
25. Bednarczyk W., Kawałko J., Rutkowski B. et al. Abnormal grain growth in a Zn-0.8Ag alloy after processing by high-pressure

- torsion. *Acta Mater* 2021;207:116667. DOI: 10.1016/j.actamat.2021.116667
26. Ren K., Zhang K., Zhang Y. et al. Effect of ECAP temperature on formation of triple heterogeneous microstructure and mechanical properties of Zn–1Cu alloy. *Mater Sci Eng A* 2021;826:141990. DOI: 10.1016/j.msea.2021.141990
27. García-Mintegui C., Córdoba L.C., Buxadera-Palmero J. et al. Zn–Mg and Zn–Cu alloys for stenting applications: from nano-scale mechanical characterization to *in vitro* degradation and biocompatibility. *Bioact Mater* 2021;6(12):4430–46. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.015
28. Retegi-Carrión S., Ferrandez-Montero A., Eguiluz A. et al. The effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions loaded at degradable PLA membranes on the proliferation and osteoinduction of MSCs. *Polymers (Basel)* 2022;14(12):2422. DOI: 10.3390/polym14122422
29. Li D., Zhang D. Yuan Q. et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of the effect of biodegradable magnesium alloys on osteogenesis. *Acta Biomater* 2022;141:454–65. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.12.032

Благодарность. Авторы выражают благодарность к.т.н. В.Е. Баженову, к.т.н. А.В. Колтыгину и профессору, д.т.н. В.Д. Белову, а также кафедре литейных технологий и художественной обработки материалов НИТУ «МИСиС» за помощь в выплавке материалов исследования.

Acknowledgment. The authors are grateful to Dr. V.E. Bazhenov, Dr. A.V. Kolytgin and Professor, Dr. V.D. Belov, as well as to Department of Casting Technologies and Artistic Processing of Materials of the National University of Science and Technology "MISIS" for assistance in smelting research materials.

Вклад авторов

Н.С. Мартыненко, Н.Ю. Анисимова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи;

М.В. Киселевский, С.В. Добаткин: формальный анализ, научное редактирование;

О.В. Рыбальченко: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Д.Р. Темралиева, Д.В. Просвирнин, С.В. Пивоварчик, Д.В. Филоненко: получение данных для анализа, анализ полученных данных.

Author's contribution

N.S. Martynenko, N.Yu. Anisimova: research design development, review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;

M.V. Kiselevskiy, S.V. Dobatkin: formal analysis and scientific editing;

O.V. Rybalchenko: review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

D.R. Temralieva, D.V. Prosvirnin, S.V. Pivovarchik, D.V. Filonenko: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data.

ORCID авторов / ORCID of authors:

Н.С. Мартыненко / N.S. Martynenko: <https://orcid.org/0000-0003-1662-1904>

Н.Ю. Анисимова / N.Yu. Anisimova: <https://orcid.org/0000-0002-4370-6578>

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

О.В. Рыбальченко / O.V. Rybalchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0403-0800>

Д.Р. Темралиева / D.R. Temralieva: <https://orcid.org/0000-0002-8392-7826>

Д.В. Просвирнин / D.V. Prosvirnin: <https://orcid.org/0000-0001-7155-0294>

С.В. Пивоварчик / S.V. Pivovarchik: <https://orcid.org/0000-0003-1073-5732>

Д.В. Филоненко / D.V. Filonenko: <https://orcid.org/0000-0002-9943-3054>

С.В. Добаткин / S.V. Dobatkin: <https://orcid.org/0000-0003-4232-927X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-23-00097).

Funding. This research was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 22-23-00097).

Статья поступила: 30.07.2022. Принята к публикации: 31.08.2022.

Article submitted: 30.07.2022. Accepted for publication: 31.08.2022.

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 комплексования 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.

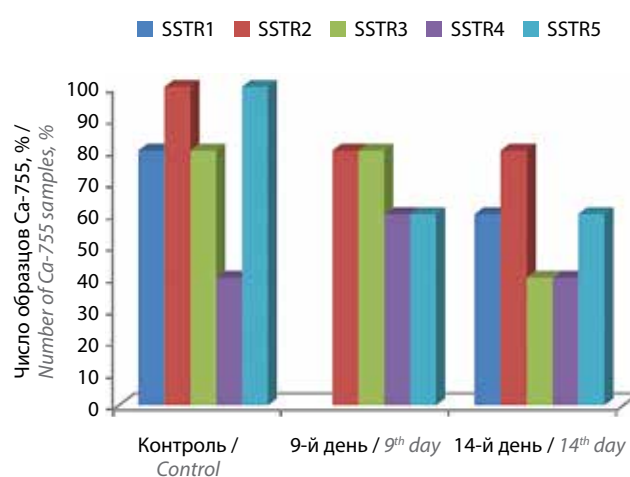


Рис. 1. Положительная экспрессия (1+/2+/3+) различных типов рецепторов к соматостатину (SSTRs) в клетках Ca-755

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

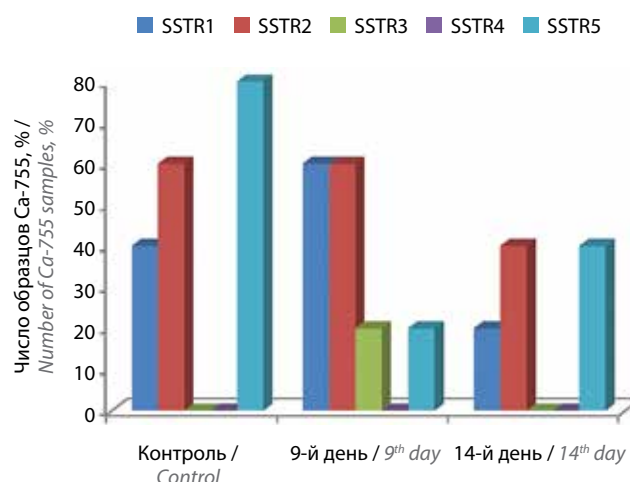


Рис. 2. Высокий уровень положительной экспрессии (2+/3+) различных типов рецепторов к соматостатину (SSTRs) в клетках Ca-755

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

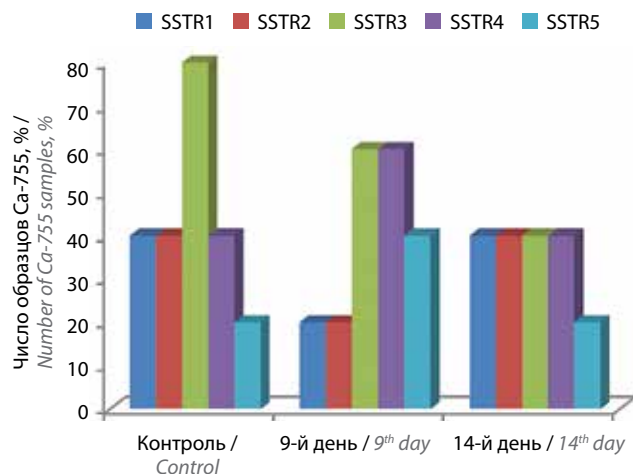


Рис. 3. Низкий уровень положительной экспрессии (1+) различных типов рецепторов к соматостатину (SSTRs) в клетках Ca-755

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

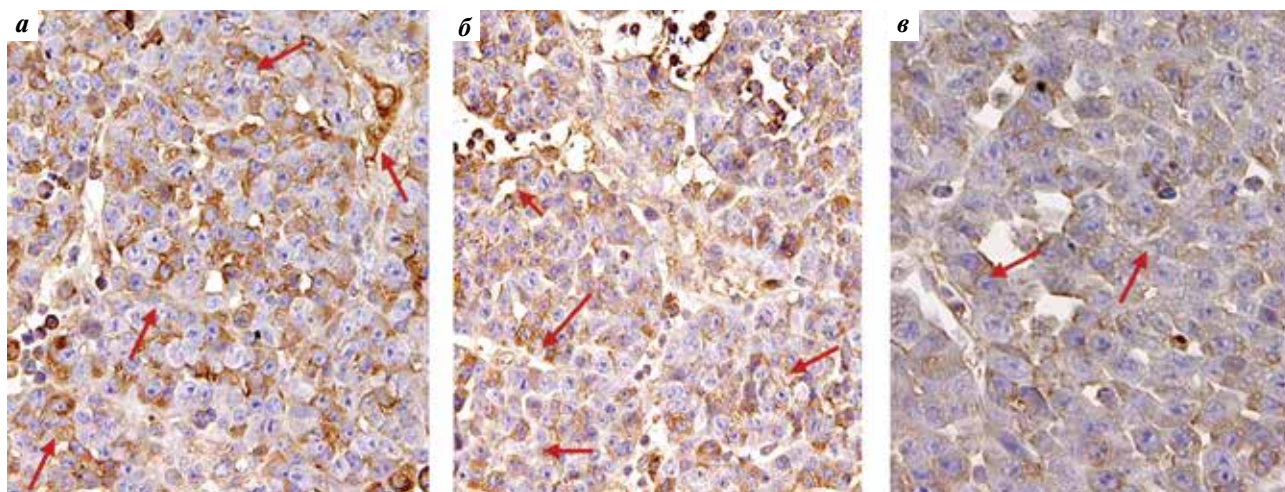


Рис. 4. Иммуногистохимическое определение экспрессии рецепторов к соматостатину 1-го типа (SSTR1) в клетках аденокарциномы молочной железы (Ca-755, генерация 3) в контроле и после введения цифетрилина: а — контрольная группа (9-й день после перевивки). Полное интенсивное окрашивание мембран 50 % клеток 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

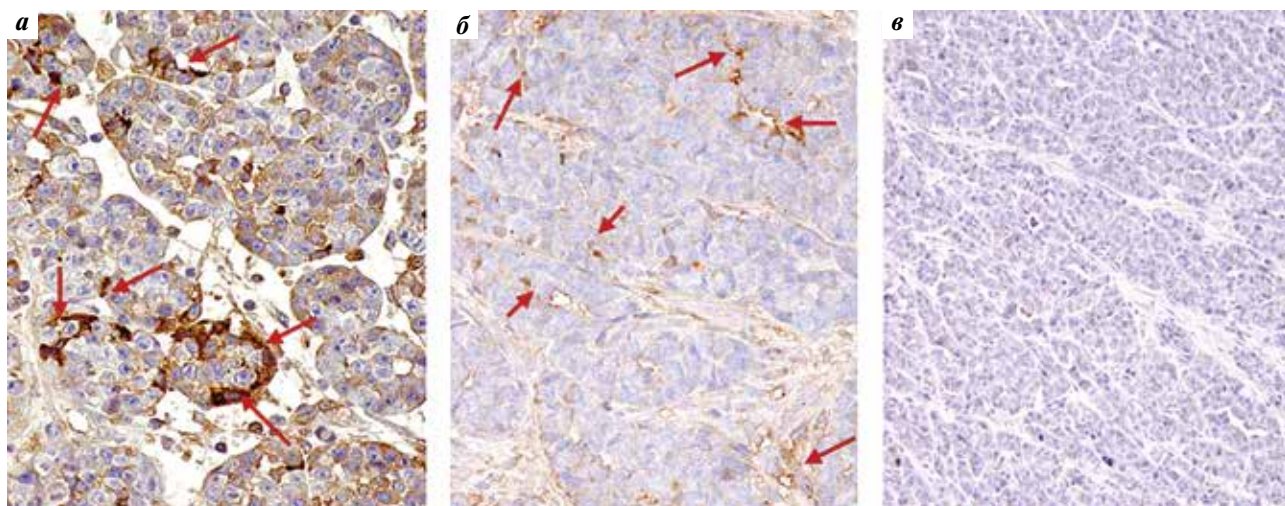


Рис. 5. Иммуногистохимическое определение экспрессии рецепторов к соматостатину 2-го типа (SSTR2) в клетках аденокарциномы молочной железы (Ca-755, генерация 3) в контроле и после введения цифетрилина: а — контрольная группа (9-й день после перевивки). Полное и частичное окрашивание мембраны 40 % клеток 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

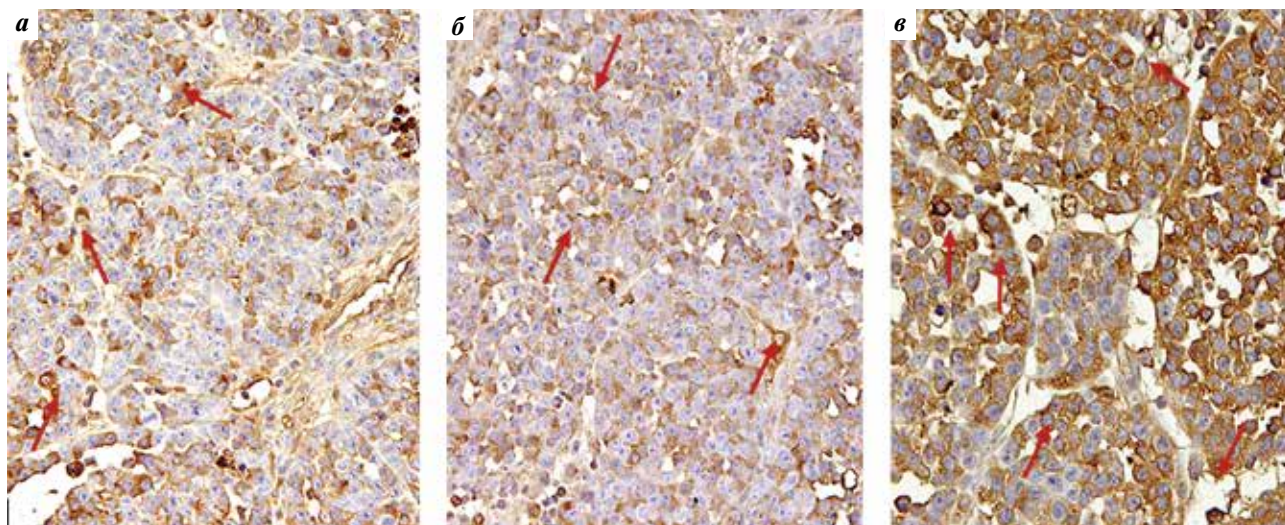


Рис. 6. Иммуногистохимическое определение экспрессии рецепторов к соматостатину 5-го типа (SSTR5) в клетках аденокарциномы молочной железы (Ca-755, генерация 3) в контроле и после введения цифетрилина: а — контрольная группа (9-й день после перевивки). Частичное окрашивание мембран 25 % клеток опухоли, 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

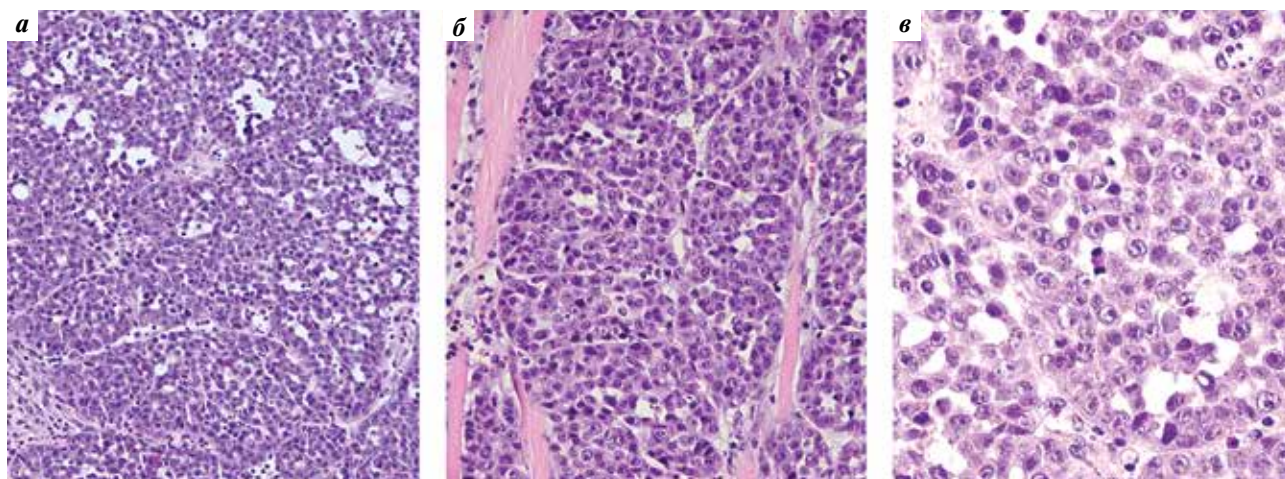


Рис. 7. Гистологическое строение аденокарциномы молочной железы Ca-755 (генерация 3) в контроле и после введения цифетрилина: а – контрольная группа (9-й день после перевивки). Клетки опухоли формируют солидные структуры, имеют округлую форму, гиперхромные ядра и эозинофильную цитоплазму ($\times 100$); 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.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-3-61-71>

Количественное определение N-гликозидного производного замещенного индола[2,3a]карбазола в инновационных лекарственных формах

Е.В. Игнатьева¹, И.В. Ярцева¹, З.С. Шпрах^{1,2}, А.П. Колпаксиди¹, М.В. Дмитриева¹, А.В. Ланцова¹, Л.Л. Николаева^{1,2}, И.Р. Просалкова¹

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

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Елена Владимировна Игнатьева chem_analysis@ronc.ru

Введение. Среди новых избирательно действующих на опухоли лекарственных веществ значительный научный интерес вызывает гликозидное производное индолакарбазола ЛХС-1269, впервые синтезированное в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Экспериментальные исследования свидетельствуют о мультитаргетном механизме действия этого соединения: ЛХС-1269 способно взаимодействовать с несколькими внутриклеточными мишенями и индуцировать разные пути клеточной гибели. Для наиболее эффективного проявления противоопухолевой активности ЛХС-1269 и его доклинического изучения получено несколько инновационных моделей лекарственной формы.

Цель исследования – разработка методик количественного определения ЛХС-1269 в фармацевтических композициях, предложенных в процессе поиска оптимальной лекарственной формы.

Материалы и методы. В работе использован метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях. Изучены спектральные характеристики растворов ЛХС-1269 в диметилформамиде, диметилсульфоксиде (ДМСО) и в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт, а также электронные спектры поглощения вспомогательных веществ в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Inc., Австралия) в диапазоне длин волн от 200 до 500 нм. Стандартный образец – субстанция ЛХС-1269 (ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России).

Результаты. Проведенные исследования показали, что растворы ЛХС-1269 в диметилформамиде, ДМСО и смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт пригодны для спектрофотометрических измерений. Разработаны варианты методики количественного определения ЛХС-1269 методом прямой спектрофотометрии в инновационных моделях лекарственной формы, отличающихся содержанием активного вещества и составом вспомогательных веществ: ЛХС-1269 концентрат для приготовления раствора для инъекций и инфузий, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, лиофилизат липосомальный для приготовления дисперсии для инъекций.

Заключение. Разработаны методики количественного определения ЛХС-1269 в моделях лекарственной формы. Показано, что предложенные методики применимы для определения ЛХС-1269 в инновационных лекарственных формах, содержащих в качестве вспомогательных веществ полимерные низкомолекулярные солюбилизаторы, липиды, холестерин, моно- или олигосахариды.

Ключевые слова: индолакарбазол, ЛХС-1269, растворимость, лекарственная форма, спектрофотометрия

Для цитирования: Игнатьева Е.В., Ярцева И.В., Шпрах З.С. и др. Количественное определение N-гликозидного производного замещенного индола[2,3a]карбазола в инновационных лекарственных формах. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):61–71. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-61-71

Quantitative determination of the N-glycoside derivative of substituted indolo[2,3a]carbazole in innovative dosage forms

Elena V. Ignatieva¹, Irina V. Yartseva¹, Zoya S. Shprakh^{1,2}, Alexander P. Kolpaksidi¹, Mariya V. Dmitrieva¹, Anna V. Lantsova¹, Lyudmila L. Nikolaeva^{1,2}, Irina R. Prosalkova¹

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

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991 Russia

Contacts: Elena Vladimirovna Ignatieva chem_analysis@ronc.ru

Background. A glycoside derivative of indolocarbazole LHS-1269, one of the new drugs selectively affecting tumors, which was first synthesized at the N.N. Blokhin National Medical-Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, is of particular scientific interest. Experimental studies demonstrated a multi-target mechanism of action of this compound. LHS-1269 interacts with several intracellular targets and induces various pathways of cell death. Several innovative models of the dosage forms were designed to achieve the highest anti-tumor activity of the compound and to perform further preclinical studies.

Aim. To develop the methods for the quantitative determination of LHS-1269 in pharmaceutical compositions proposed as a result of the search for the optimal dosage form.

Materials and methods. The study analyzed the spectrophotometric characteristics of LHS-1269 solutions in dimethylformamide, dimethylsulfoxide (DMSO) and in the mixture of solvents DMSO–ethyl alcohol, as well as electronic absorption spectra of the excipients in the mixture of solvents DMSO–ethyl alcohol. Spectrophotometric measurements were performed on a Cary 100 spectrophotometer (Varian, Inc., Australia) in the wavelength range from 200 to 500 nm. The standard sample is the substance LHS-1269 (N.N. Blokhin Oncology Research Center of the Ministry of Health of Russia).

Results. The carried out studies showed that LHS-1269 solutions in dimethylformamide, DMSO and mixture of DMSO–ethyl alcohol are suitable for spectrophotometric measurements. Several variants of the methodology for the assay of LHS-1269 in various dosage form models that differ in the content of the active substance and the excipients composition have been developed: LHS-1269 concentrate for solution for injection and infusion; lyophilisate for solution for injection; liposomal lyophilisate for dispersion for injection.

Conclusion. Techniques for the assay of LHS-1269 in dosage form models have been developed. It has been shown that the developed techniques are applicable for LHS-1269 quantitative determination in innovative dosage forms containing polymeric low molecular weight solubilizers, lipids, cholesterol, mono- or oligosaccharides as excipients.

Keywords: indolocarbazole, LHS-1269, solubility, dosage form, spectrophotometry

For citation: Ignatieva E.V., Yartseva I.V., Shprakh Z.S. et al. Quantitative determination of the N-glycoside derivative of substituted indolo[2,3a]carbazole in innovative dosage forms. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(3):61–71. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-61-71

Введение

Одним из актуальных направлений повышения эффективности лекарственной терапии онкологических заболеваний является поиск новых избирательно действующих на опухоли лекарственных веществ, их рациональных лекарственных форм (ЛФ), позволяющих совершенствовать методы комплексного и комбинированного лечения злокачественных новообразований. Все больший научный интерес для практической онкологии представляют гликозидные производные индолокарбазолов. Соединения этого класса обладают способностью взаимодействовать с несколькими внутриклеточными мишенями и индуцировать разные пути клеточной гибели [1–3]. В лаборатории химического синтеза Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработан метод получения

производных индоло[2,3a]карбазолов [4]. Среди ряда представителей этого класса впервые синтезирован N-[12-(1-β-D-ксилопиранозил)индоло[2,3a]пирроло-[3,4c]карбазол-5,7-дион-6-ил]пиридин-2-карбоксамид (ЛХС-1269), структурная формула которого представлена на рис. 1 [4, 5].

Экспериментальные исследования свидетельствуют о мультитаргетном механизме действия ЛХС-1269: способность модулировать экспрессию генов, вовлеченных в неопластическую трансформацию и опухолевую прогрессию [2]; активировать интерферон-сигналинг, действуя на ДНК и структуру хроматина [6]; ингибировать васкулогенную мимикрию [7]. В исследованиях *in vivo* ЛХС-1269 показало высокий противоопухолевый эффект на асцитных моделях опухоли Эрлиха, раке толстого кишечника АКАТОЛ, раке шейки матки РШМ-5, лимфолейкозе Р-388 и, таким образом, представляет интерес для терапии злокачественных новообразований [8–10].

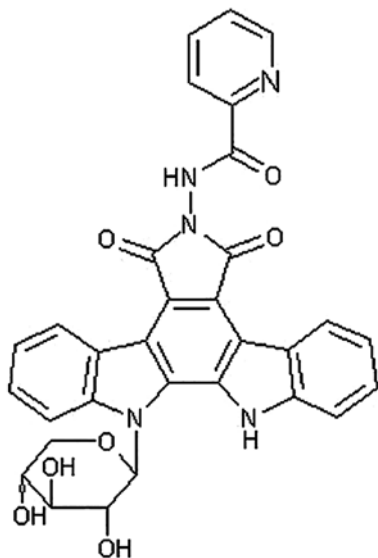


Рис. 1. Структурная формула ЛХС-1269

Fig. 1. The structural formula of LHS-1269

Для оптимального проявления противоопухолевой активности нового лекарственного средства ЛХС-1269 и его доклинического изучения следовало разработать экспериментальные модели ЛФ, обеспечивающие оптимальное содержание лекарственного вещества в ЛФ, устойчивость полученной ЛФ при хранении, предусмотреть путь введения лекарственного средства в организм и способ доставки его в опухоль. Важным этапом создания нового противоопухолевого средства является разработка методов контроля его качества.

Следует отметить, что к качеству противоопухолевых препаратов предъявляются повышенные требования, что объясняется особенностями их влияния на организм — наряду со специфическим действием на опухоль, противоопухолевые средства воздействуют на другие ткани и системы организма, что приводит к развитию серьезных побочных явлений [11, 12].

Цель исследования — разработка методик количественного определения ЛХС-1269 в фармацевтических композициях, предложенных в процессе поиска оптимальной ЛФ.

Материалы и методы

В работе использовали субстанцию ЛХС-1269 (ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), содержащую не менее 97 % действующего вещества (метод высокоэффективной жидкостной хроматографии) и соответствующую требованиям к фармацевтическим субстанциям, используемым в лекарственных препаратах; растворители: воду очищенную (ФС.2.2.0020.15), диметилсульфоксид (ДМСО) хч («Химмед», Россия), диметилформамид (ДМФА) хч («Химмед», Россия), спирт этиловый 96 % (ООО

«Константа-Фарм М», Россия); вспомогательные вещества (ВВ): повидон (Kollidon 17 PF) (BASF The Chemical Company, Германия), полисорбат 20 (MontanoxTM 20 PPI) (Seppic), яичный фосфатидилхолин Е РС S (Lipoid, Германия), холестерин ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, Япония), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтанолламин (Lipoid, Германия), сахарозу чда («Химмед», Россия).

Взвешивание образцов проводили на аналитических весах Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), спектрофотометрические измерения осуществляли на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Inc., Австралия).

Результаты

Для определения подлинности и количественного анализа производных индоло[2,3a]карбазола используются спектрометрические (инфракрасная и ультрафиолетовая спектрометрия) и хроматографические (тонкослойная хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография) методы [13]. При определении содержания активного вещества в ЛФ широко применяется надежный и относительно простой метод спектрофотометрии, отличающийся высокой достоверностью, воспроизводимостью и точностью [14, 15].

ЛХС-1269 представляет собой аморфный порошок желто-оранжевого цвета, без запаха. Отличительной особенностью этого соединения является низкая растворимость. Согласно принятой в Государственной фармакопее Российской Федерации (XIV издание) классификации растворимости ЛХС-1269 растворим в ДМСО, умеренно растворим в ДМФА, очень мало растворим в спирте этиловом 96 % и практически нерастворим в воде [16]. Низкая растворимость ЛХС-1269 значительно усложняла работу как в ходе исследований по поиску оптимальной ЛФ, так и при анализе предлагаемых моделей ЛФ, которые отличались по агрегатному состоянию [16], количественному содержанию активного вещества и составу ВВ.

На 1-м этапе исследований нами были получены электронные спектры поглощения (ЭСП) разбавленных растворов (0,004 мг/мл) ЛХС-1269 в апротонных полярных растворителях ДМФА и ДМСО. Растворы ЛХС-1269 в этих растворителях устойчивы при комнатной температуре, их спектры идентичны и содержат в области от 200 до 500 нм максимумы поглощения при длинах волн 286 ± 2 нм (удельный показатель поглощения $E_{1\text{ см}}^{1\%} = 516$) и 317 ± 2 нм ($E_{1\text{ см}}^{1\%} = 1079$); слабо интенсивный максимум при длине волны 413 ± 2 нм ($E_{1\text{ см}}^{1\%} = 92$); плечо при 308 ± 2 нм; плечо при 337 ± 2 нм и минимумы при 278 ± 2 нм, 295 ± 2 нм и 375 ± 2 нм (рис. 2). Отношение значений оптической плотности в максимумах D_{319}/D_{286} для изученных образцов составляло $1,9 \pm 0,1$.

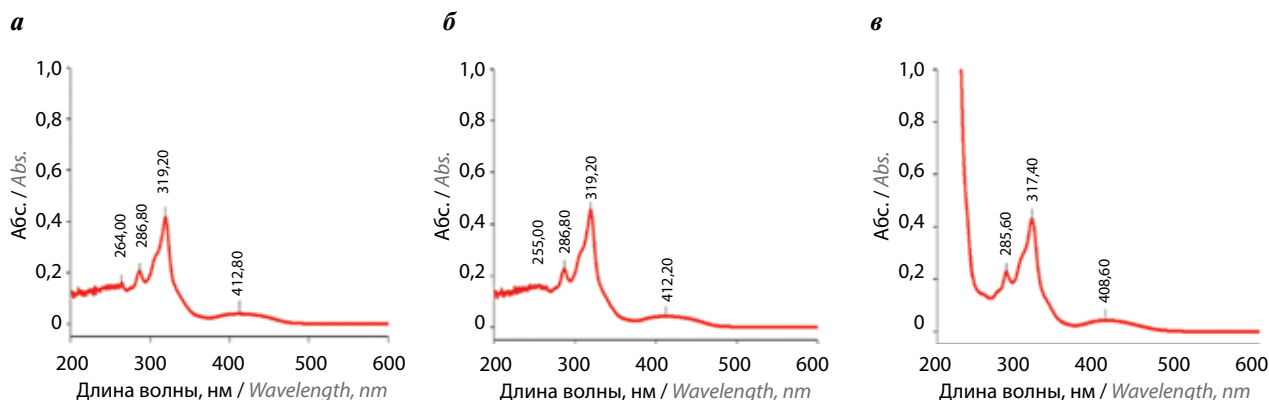


Рис. 2. Электронные спектры поглощения 0,004 мг/мл растворов ЛХС-1269: в диметилформамиде (а); в ДМСО (б); в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт 1:1250 (в). Здесь и на рис. 3–6: ДМСО–диметилсульфоксид

Fig. 2. Electronic absorption spectra of 0.004 mg/ml of solutions of LXS-1269: in dimethylformamide (a); in DMSO (b); in a mixture of solvents DMSO–ethyl alcohol 1:1250 (c). Here and in figures 3–6: DMSO – dimethylsulfoxide

Нами показано, что даже при разбавлении растворов ЛХС-1269 в ДМСО этиловым спиртом более чем в 1000 раз растворы остаются прозрачными и их спектральные характеристики не изменяются по сравнению с растворами в ДМФА или в ДМСО (см. рис. 2). Это позволило использовать в дальнейших исследованиях более доступную и удобную в работе смесь растворителей ДМСО–этиловый спирт.

Нами также показано, что ЭСП растворов ЛХС-1269 в любом из перечисленных растворителей и в смеси ДМСО–этиловый спирт в диапазоне концентраций от 0,003 до 0,010 мг/мл подчиняются закону Бугера–Ламберта–Бера, и наиболее интенсивный максимум поглощения при 317 ± 2 нм может служить аналитическим сигналом. Ниже приведен график, отражающий зависимость оптической плотности раствора ЛХС-1269 от концентрации в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт при длине волны 317 нм (рис. 3).

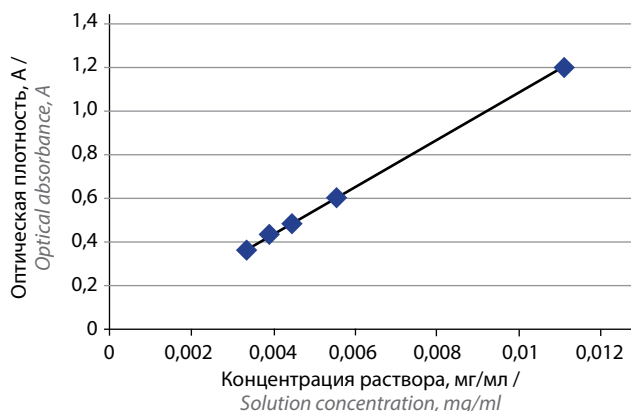


Рис. 3. Зависимость оптической плотности растворов ЛХС-1269 в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт 1:1250 от концентрации

Fig. 3. Optical density of LXS-1269 solutions in the mixture of solvents DMSO–ethyl alcohol 1:1250 in relation to the concentrations

Таким образом, на основании полученных спектральных характеристик растворов ЛХС-1269 в ДМФА, ДМСО и в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт мы показали, что для количественного определения ЛХС-1269 в моделях ЛФ можно применять метод спектрофотометрии [17].

Разработку методики количественного определения ЛХС-1269 в ЛФ проводили на 3 моделях: модель 1 – ЛХС-1269 концентрат для приготовления раствора для инъекций и инфузий 25 мг; модель 2 – ЛХС-1269 лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 10 мг; модель 3 – ЛХС-1269 лиофилизат липосомальный для приготовления дисперсии для инъекций 1,2 мг.

Модель 1 представляла собой вязкую жидкость желтого цвета во флаконах вместимостью 20 мл.

Помимо действующего вещества композиция содержала ДМСО, этиловый спирт и Kollidon 17 PF. При добавлении к содержимому флакона этилового спирта получали прозрачный раствор, ЭСП которого по форме, положению максимумов и их интенсивности соответствовал спектру раствора ЛХС-1269 в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт. ВВ, использованные в данной модели ЛФ, не имеют собственного поглощения в аналитической области от 270 до 500 нм и не влияют на спектральные характеристики ЛХС-1269 в растворе. Незначительное поглощение (около 0,06–0,08 единиц оптической плотности) отмечали лишь в спектре раствора Kollidon 17 PF при 264 ± 2 нм, но оно не мешало определению активного вещества в аналитическом максимуме (рис. 4).

В методику анализа введен способ расчета по стандартному образцу (СО), в качестве которого использовали субстанцию ЛХС-1269, из которой была получена ЛФ. При расчетах учитывали содержание активного вещества в субстанции.

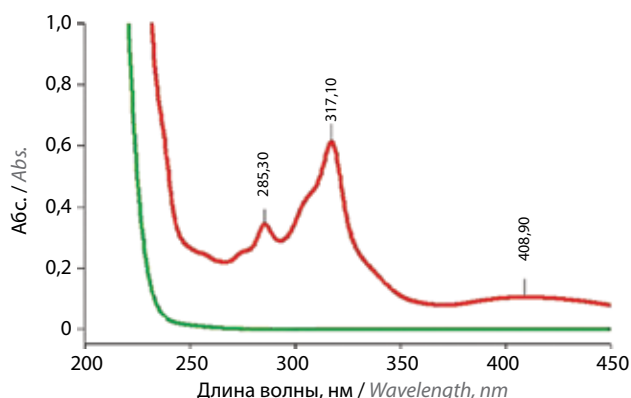


Рис. 4. Электронный спектр поглощения растворов модели 1 (красная линия) и вспомогательных веществ (зеленая линия) в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт

Fig. 4. Electronic absorption spectrum of Model 1 solutions (red line) and excipients (green line) in a mixture of DMSO–ethyl alcohol solvents

Методика анализа. Испытуемый раствор: к содержимому флакона добавляют около 10 мл спирта этилового 96 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки тем же растворителем, перемешивают; 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор СО: около 6 мг (точная навеска) ЛХС-1269 растворяют в 1 мл ДМСО, добавляют около 10 мл спирта этилового 96 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают; 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор сравнения — спирт этиловый 96 %.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора относительно раствора сравнения на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 317 ± 2 нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора СО относительно раствора сравнения.

Содержание ЛХС-1269 во флаконе (X, мг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 100 \times 50}{A_0 \times 50 \times 25} = \frac{A \times a_0 \times 4}{A_0},$$

где: A — оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 — оптическая плотность раствора СО; a_0 — навеска СО, мг.

Содержание ЛХС-1269 во флаконе должно быть в пределах от 22,5 до 27,5 мг.

Результаты 9 параллельных определений ЛХС-1269 в модели 1 приведены в табл. 1, 2. Численное значение коэффициента нормированных отклонений (коэффициента Стьюдента, $t(p, f)$), рассчитанное по результатам анализа, составило 1,14, что значительно ниже табличного значения (2,31). Относительная ошибка среднего результата ($\bar{\epsilon}$, %) была меньше 2 % и равнялась 0,75 %, т. е. результаты, полученные при использовании методики, не содержат систематических ошибок.

Правильность методики подтверждали анализом серии модельных смесей. Поскольку содержание ЛХС-1269 в единице ЛФ составляет 25 мг и методика может быть использована для определения однородности дозирования, диапазон ее применения расширен от 70 до 130 % от номинальной дозы. Модельные смеси готовили из ВВ с добавлением навески, соответствующей 70, 100 и 130 % от номинального содержания ЛХС-1269 в препарате. На каждом уровне проводили по 3 определения, всего было выполнено 9 определений. Результаты анализа оценивали, сравнивая полученные результаты с ожидаемым значением величины (содержание ЛХС-1269 в модельной смеси в мг). Полученные данные представлены в табл. 3, 4.

Спектрофотометрическая методика определения содержания основного действующего вещества ЛХС-1269 в ЛФ может быть признана правильной, так как относительная погрешность среднего результата измеряемой величины $\bar{\epsilon}$ не превышает 2 %; полученные результаты приближаются к истинному значению и лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ($\bar{x} \pm \Delta x$), который составил $99,87 \pm 1,55$ %, а относительная погрешность среднего результата ($\bar{\epsilon}$) не превышает 1,55 %.

При изучении противоопухолевой активности модель 1 показала хорошие результаты. Однако в ходе исследования проявился ряд недостатков, связанных, прежде всего, с собственной фармакологической активностью ДМСО. Кроме того, из-за образования комплекса между ДМСО и этиловым спиртом модель 1 не удалось лиофилизировать.

Модель 2. В ходе дальнейшей работы как прототип ЛФ, не содержащей ДМСО, предложена композиция, в состав которой включили комплекс солюбилизаторов (повидон (Kollidon 17 PF) и полисорбат 20 (MontanoxTM20)), — модель 2. Для стабилизации модели 2 применили лиофилизацию [18, 19].

Образцы лиофилизированной модели 2 представляли собой сухую пористую массу желтого цвета во флаконах вместимостью 10 мл. При добавлении к содержимому флакона 2 мл воды с последующим встряхиванием в течение 5 мин получали растворы,

Таблица 1. Результаты количественного определения ЛХС-1269 в концентрате для приготовления раствора для инъекций и инфузий 25 мг (модель 1)

Table 1. The results of quantitative determination of LHS-1269 in the concentrate for the preparation of the solution for injections and infusions, 25 mg (model 1)

Показатель Parameter	Определение Test								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Оптическая плотность испытуемого раствора (А) Optical density of the tested solution (A)	0,469	0,473	0,477	0,479	0,472	0,480	0,471	0,467	0,470
Найдено ЛХС-1269, мг LHS-1269, mg	24,870	25,098	25,280	25,052	25,417	25,462	24,961	24,779	24,916

Примечание. Использовали навеску стандартного образца $a_0 = 6,774$ мг (в пересчете на активное вещество); оптическая плотность раствора стандартного образца: $A_0 = 0,511$.

Note. The weight of the used standard sample $a_0 = 6.774$ mg (in terms of the active substance); optical density of standard sample solution: $A_0 = 0.511$.

Таблица 2. Метрологические характеристики среднего результата анализа (модель 1)

Table 2. Metrological characteristics of the average analysis result (model 1)

Число тестов, n Number of tests, n	f	$\bar{X}$, мг $\bar{X}$, mg	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P, %	t (p, f) табличное t (p, f) reference value	t (p, f) вычисленное t (p, f) calculated value	Δx	$\bar{e}$, %
9	8	25,093	0,059	0,244	0,081	95	2,306	1,142	0,187	0,75

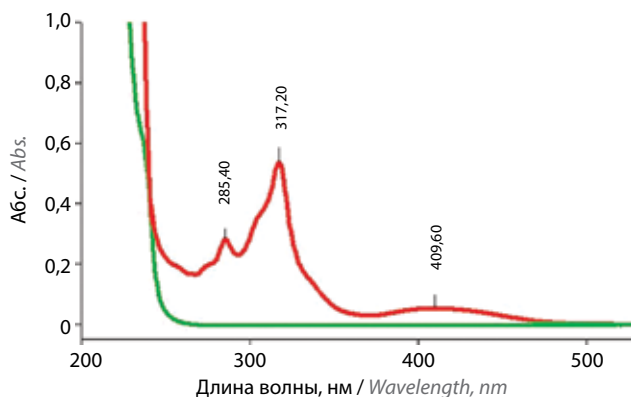


Рис. 5. Электронный спектр поглощения растворов модели 2 (красная линия) и вспомогательных веществ (зеленая линия) в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт

Fig. 5. Electronic absorption spectrum of model-2 solutions (red line) and excipients (green line) in a mixture of DMSO–ethyl alcohol solvents

которые оставались прозрачными при разведении этиловым спиртом и имели ЭСП, характерный для ЛХС-1269. Было показано также, что спиртовые растворы ВВ, входящих в состав модели 2, не имеют собственного поглощения в области аналитического максимума (рис. 5). Количественное определение ЛХС-1269 проводили в соответствии со спектрофотометрической методикой, описанной выше, используя в качестве основного растворителя этиловый

спирт и модифицировав приготовление испытуемого раствора.

Испытуемый раствор: к содержимому флакона добавляют 2 мл воды, 2 мл ДМСО, около 10 мл спирта этилового 96 %, полученный прозрачный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают; 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят до метки спиртом этиловым 96 % и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора СО и определение выполняют по методике, разработанной для модели 1.

Содержание ЛХС-1269 во флаконе (X, мг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 50 \times 50}{A_0 \times 50 \times 25} = \frac{A \times a_0 \times 2}{A_0},$$

где: A — оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 — оптическая плотность раствора СО; a_0 — навеска СО, мг.

Содержание ЛХС-1269 в одном флаконе должно находиться в пределах от 9,0 мг до 11,0 мг.

Результаты количественного определения ЛХС-1269 в модели 2 представлены в табл. 5.

Таблица 3. Результаты оценки правильности методики количественного определения ЛХС-1269 в модели лекарственной формы ЛХС-1269 концентрат для приготовления раствора для инъекций и инфузий 25 мг

Table 3. Results of determining the correctness of the method of quantitative determination of LHS-1269 in the model of dosage form LHS-1269 concentrate for the preparation of a solution for injections and infusions of 25 mg

Содержание ЛХС-1269 от номинального, % The content of LHS-1269 from the nominal, %	№ теста Test No.	Содержание ЛХС-1269 в анализируемой пробе, мг The content of LHS-1269 in the analyzed sample, mg	Найдено ЛХС-1269, мг LHS-1269, mg	Степень обнаружения, % Degree of detection, %	Среднее значение в трипликате, % Average value in triplicate, %
70	1	17,68	18,09	102,32	99,31
	2	17,38	16,93	97,41	
	3	17,71	17,39	98,19	
100	4	25,47	25,36	99,57	99,78
	5	25,12	25,45	101,31	
	6	25,83	25,43	98,45	
130	7	32,59	31,86	97,76	100,52
	8	32,38	33,21	102,56	
	9	32,63	33,04	101,26	

Таблица 4. Метрологические характеристики среднего результата анализа (оценка правильности методики для модели 1)

Table 4. Metrological characteristics of the average analysis result (determining the correctness of the method for model 1)

Число тестов, n Number of tests, n	f	$\bar{x}$, % $\bar{x}$, %	S ²	S	S $\bar{x}$	P, %	t (p, f) табличное t (p, f) reference value	t (p, f) вычисленное t (p, f) calculated value	Δx	$\bar{e}$, %
9	8	99,87	4,08460	2,02104	0,67368	95	2,306	0,193	1,554	1,55

Модель 3. В качестве еще одной модели ЛФ ЛХС-1269 для внутривенного введения, не содержащей ДМСО, предложена липосомальная ЛФ. В состав липосомальной ЛФ, помимо активного вещества, включили яичный фосфатидилхолин, холестерин и полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтанолламин [20].

Липосомальная ЛФ представляла собой дисперсию желтого цвета, содержащую 0,3 мг/мл ЛХС-1269. При добавлении к липосомальной дисперсии ДМСО и этилового спирта получали прозрачный раствор, ЭСП которого по форме и положению максимумов соответствовал спектру раствора ЛХС-1269. Для изучения влияния ВВ, входящих в состав липосомальной ЛФ, на количественные характеристики ЛХС-1269 получен ЭСП раствора липосом, не нагруженных активным веществом. ЭСП ненагруженных липосом в области от 200 до 500 нм содержал 2 пика низкой интенсивности (менее 0,1 единицы оптической плотности) при 268 ± 2 нм и 279 ± 2 нм. На рис. 2, в представлен ЭСП СО, а на рис. 6 – испытуемого раствора и раствора ВВ в концентрациях, соответствующих

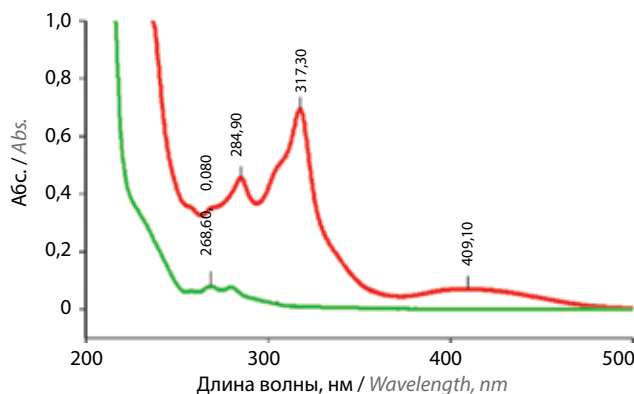


Рис. 6. Электронный спектр поглощения растворов модели 3 (красная линия) и вспомогательных веществ (зеленая линия) в смеси растворителей ДМСО–этиловый спирт

Fig. 6. Electronic absorption spectrum of model 3 solutions (red line) and excipients (green line) in a mixture of DMSO–ethyl alcohol solvents

разбавлению испытуемого раствора данной ЛФ. Из рисунков видно, что при рабочей длине волны 317 нм максимумы растворов СО и испытуемого раствора совпадают, а поглощение раствора ВВ стремится

Таблица 5. Результаты количественного определения ЛХС-1269 в лиофилизате для приготовления раствора для инъекций 10 мг (модель 2)
Table 5. Results of quantitative determination of LHS-1269 in lyophilisate for solution for injection 10 mg (model 2)

Испытуемый образец Test sample	Стандартный образец Standard sample		Оптическая плотность испытуемого раствора (A) Optical density of test solution (A)	Найдено ЛХС-1269, мг LHS-1269, mg
	Навеска (a ₀)*, мг Weight (a ₀)*, mg	Оптическая плотность (A ₀) Optical density (A ₀)		
1	6,776	0,511	0,354	9,39
			0,363	9,63
2	6,776	0,511	0,370	9,81
			0,375	9,94
3	6,776	0,511	0,406	10,77
			0,394	10,45
4	4,820	0,411	0,451	10,58
			0,445	10,44
5	4,548	0,384	0,442	10,47
			0,429	10,16
6	4,548	0,384	0,446	10,56
			0,442	10,47

*Навеска стандартного образца (a₀) приведена в пересчете на активное вещество.

*The weight of the standard sample (a₀) is given in terms of active substance.

Примечание. Здесь и в табл. 6 для каждого образца приведены результаты анализа 2 единиц (флаконов) лекарственной формы.

Note. Here and in table 6, for each sample, the results of the analysis of two units (vials) of the dosage form are presented.

к нулю и не оказывает влияния на величину оптической плотности в рассматриваемом максимуме.

В ходе изучения липосомальной дисперсии ЛХС-1269 установлено, что она неустойчива при хранении. Для получения стабильной ЛФ липосомальную дисперсию лиофилизировали, используя в качестве криопротектора сахарозу [21]. Этот олигосахарид не имеет хромофора, его водные растворы прозрачны в используемой нами аналитической области. Однако сахара очень мало растворима в этиловом спирте. Поэтому при анализе ЛФ для регидратации лиофилизата и растворения сахарозы на стадии приготовления испытуемого раствора к содержимому флакона добавляли воду. При этом получали прозрачный раствор, пригодный для спектрофотометрических измерений, а входящие в состав модели 3 ВВ не мешали определению основного вещества.

Испытуемый раствор: к содержимому флакона добавляют 4 мл воды, 0,2 мл ДМСО и около 10 мл спирта этилового 96 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки спиртом этиловым 96 %, перемешивают; 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки спиртом

этиловым 96 % и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление *раствора СО* и определение выполняют по методике, разработанной для модели 1.

Содержание ЛХС-1269 во флаконе (X, мг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times a_0 \times 50 \times 25}{A_0 \times 50 \times 25 \times 5} = \frac{A \times a_0}{A_0 \times 5},$$

где: A — оптическая плотность испытуемого раствора; A₀ — оптическая плотность раствора СО; a₀ — навеска СО, мг.

Содержание ЛХС-1269 во флаконе должно быть в пределах от 1,08 до 1,32 мг.

Результаты количественного определения ЛХС-1269 в лиофилизированной липосомальной модели приведены в табл. 6.

Закключение

Проведенные исследования показали, что ЛХС-1269 имеет характерный ЭСП в апротонных полярных растворителях ДМФА и ДМСО. При сильном

Таблица 6. Результаты количественного определения ЛХС-1269 в лиофилизате липосомальном для приготовления дисперсии для инъекций 1,2 мг (модель 3)

Table 6. Results of quantitative determination of LHS-1269 in liposomal lyophilisate for dispersion for injection 1.2 mg (model 3)

Испытуемый образец Test sample	Стандартный образец Standard sample		Оптическая плотность испытуемого раствора (A) Optical density of test solution (A)	Найдено ЛХС-1269, мг LHS-1269, mg
	Навеска (a_0)*, мг Weight (a_0)*, mg	Оптическая плотность (A_0) Optical density (A_0)		
1	6,305	0,515	0,479	1,173
			0,481	1,178
2	6,305	0,515	0,495	1,212
			0,497	1,217

*Навеска стандартного образца (a_0) приведена в пересчете на активное вещество.

*The weight of the standard sample (a_0) is given in terms of active substance.

разведении растворов ЛХС-1269 в ДМСО спиртом этиловым 96 % растворы остаются прозрачными и характеристики спектра при этом не изменяются; растворы остаются пригодными для спектрофотометрических измерений.

На основании полученных данных разработана спектрофотометрическая методика количественного определения ЛХС-1269 в модели ЛФ ЛХС-1269 концентрат для приготовления раствора для инъекций и инфузий 25 мг. Показано, что данная методика в аналитическом диапазоне от 70 до 130 % от номинального содержания основного действующего вещества в единице ЛФ обеспечена приемлемой правильностью и не содержит систематических ошибок. Полученные

результаты соответствуют критериям, рекомендуемым Государственной фармакопеей Российской Федерации.

Показано, что с учетом особенностей приготовления испытуемых растворов (в зависимости от состава ЛФ) разработанная методика применима для определения содержания ЛХС-1269 в ЛФ ЛХС-1269 лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 10 мг и ЛХС-1269 лиофилизат липосомальный для приготовления дисперсии для инъекций 1,2 мг.

Предложенная методика может быть применима для определения содержания ЛХС-1269 в инновационных ЛФ, включающих в качестве ингредиентов полимерные низкомолекулярные солюбилизаторы, липиды, холестерин, моно- или олигосахариды.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Janosik T., Rannug A., Rannug U. et al. Chemistry and properties of indolocarbazoles. Chem Rev 2018;118(18):9058–128. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00186
- Zenkov R.G., Ektova L.V., Vlasova O.A. et al. Indolo[2,3-a]carbazoles: diversity, biological properties, application in antitumor therapy. Chem Heterocycl Compd 2020;56(6):644–58. DOI: 10.1007/s10593-020-02714-4
- Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазола ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(3):25–32. Lantsova A.V., Sanarova E.V., Oborotova N.A. et al. Development of technology for injectable dosage form based on the national substance from the class of indolocarbazoles – LHS-1208. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(3):25–32. (In Russ.).
- Голубева И.С., Еремина В.А., Моисеева Н.И. и др. Производное класса N-гликозидов индоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-5,7-дионов-N-{2-(β-d-ксило-пиранозил)-5,7-диоксо-индоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-6-ил}пиридин-2-карбоксамид, обладающее цитотоксической и противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2667906 от 11.09.2017. Golubeva I.S., Eremina V.A., Moiseeva N.I. et al. A derivative of the class of N-glycosides indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-diones-N-{2-(β-d-xylo-pyranosyl)-5,7-dioxo-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-6-yl}pyridine-2-carboxamide with cytotoxic and antitumor activity. Patent RU No. 2667906 dated 11.09.2017. (In Russ.).
- Эктова Л.В., Еремина В.А., Тихонова Н.И. и др. Синтез и цитотоксическая активность N-гликозидов индоло[2,3-a]пирроло[3,4-c]карбазол-5,7-дионов, замещенных по малеимидному атому азота. Химико-фармацевтический журнал 2020;54(5):26–9. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-5-26-29 Ektova L.V., Eremina V.A., Tikhonova N.I. et al. Synthesis and cytotoxicity of N-glycosides of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-diones substituted at the maleimide nitrogen atom. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Chemical and Pharmaceutical Journal 2020;54(5):26–9. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-5-26-29
- Zenkov R.G., Vlasova O.A., Maksimova V.P. et al. Molecular mechanisms of anticancer activity of N-glycosides

- of indolocarbazoles LCS-1208 and LCS-1269. *Molecules* 2021;26(23):7329. DOI: 10.3390/molecules26237329
7. Vartanian A., Baryshnikova M., Burova O. et al. Inhibitor of vasculogenic mimicry restores sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-damaging agents. *Melanoma Res* 2017;27(1):8–16. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000308
 8. Kiseleva M.P., Borisova L.M., Smirnova G.B. et al. Antiproliferative activity of new derivative from the class of N-glycoside of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles. *Research Result Pharmacol* 2021;8(2):49–57. DOI: 10.3897/rpharmacology.8.79424
 9. Яворская Н.П., Голубева И.С., Эктова Л.В. и др. Противоопухолевая активность индолокарбазола ЛХС-1269. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(1):125. Yavorskaya N.P., Golubeva I.S., Ektova L.V. et al. Antitumor activity of indolocarbazole LHS-1269. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(1):125. (In Russ.).
 10. Голубева И.С., Яворская Н.П., Эктова Л.В. и др. Противоопухолевая активность некоторых производных N-гликозидов индоло[2,3-a]карбазолов с углеводным остатком ксилозой. *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(4):86–93. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-86-93 Golubeva I.S., Yavorskaya N.P., Ektova L.V. et al. Antitumor activity of some derivatives of indolo[2,3-a]carbazoles N-glycosides with xylose carbohydrate residue. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(4):86–93. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-86-93
 11. Basak D., Arrighi S., Darwiche Y., Deb S. Comparison of anticancer drug toxicities: paradigm shift in adverse effect profile. *Life (Basel)* 2022;12(1):48. DOI: 10.3390/life12010048
 12. Savelli M., Roche M., Curti C. et al. Methods to control anticancer chemotherapy preparations ranked by risk analysis. *Pharmazie* 2018;73(5):251–9. DOI: 10.1691/ph.2018.7205.
 13. Козин Д.А., Шпрах З.С., Решетняк В.Ю. и др. Производные индоло[2,3-a]карбазола, обладающие противоопухолевой активностью, и инструментальные методы их исследования (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств* 2020;9(4):128–35. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135 Kozin D.A., Shprakh Z.S., Reshetnyak V.Yu. et al. Indolo[2,3-a]carbazole derivatives with antitumor activity and instrumental methods for their investigation (review). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration* 2020;9(4):128–35. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-128-135
 14. Шпрах З.С., Игнатова Е.В., Ярцева И.В. и др. Разработка и валидация методики количественного определения ципетрилина в таблетках. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(3):55–61. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61 Shprakh Z.S., Ignateva E.V., Yartseva I.V. et al. Development and validation of cyphetrylin assay in tablets. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(3):55–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61
 15. Игнатова Е.В., Ярцева И.В., Шпрах З.С. и др. Разработка и валидация методики количественного определения димерного макроциклического танина в лекарственной форме. *Разработка и регистрация лекарственных средств* 2020;9(4):93–8. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98 Ignateva E.V., Yartseva I.V., Shprakh Z.S. et al. Development and validation of dimeric macrocyclic tannin assay method in dosage forms. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration* 2020;9(4):93–8. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98
 16. Государственная фармакопея РФ XIV изд., т. 1, ОФС.1.2.1.1.0003.15; ОФС.1.2.1.0005.15; т. 2, ОФС.1.4.1.0001.15. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV Ed., Vol. 1, General Monograph. 1.2.1.1.0003.15; General Monograph. 1.2.1.0005.15; Vol. 2, General Monograph. 1.4.1.0001.15. (In Russ.).
 17. Ignateva E.V., Yartseva I.V., Shprakh Z.S. Spectrophotometry for quantitative determination of LHS-1269 in the dosage form for injection. *Materials of the 4th Russian conference on medicinal chemistry with international participants: report abstract*. Ekaterinburg, 2019. 356 p.
 18. Оборотова Н.А., Николаева Л.Л., Король Л.А. Особенности создания лиофилизированных противоопухолевых препаратов (обзор). *Биофармацевтический журнал* 2020;12(3):3–13. DOI: 10.30906/2073-8099-2020-12-3-3-13 Oborotova N.A., Nikolaeva L.L., Korol L.A. et al. Features of the creation of lyophilized anticancer drugs (review). *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal* 2020;12(3):3–13. (In Russ.). DOI: 10.30906/2073-8099-2020-12-3-3-13
 19. Oborotova N.A., Shprakh Z.S., Bagirova V.L. et al. Development of a new injection form of cytostatics using poly(vinyl pyrrolidone). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2001;35(5):274–8. DOI: 10.1023/A:1011973524048
 20. Лугань Б., Дмитриева М.В., Орлова О.Л. и др. Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индолокарбазола. *Разработка и регистрация лекарственных средств* 2020;9(3):21–6. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26 Lugen B., Dmitrieva M.V., Orlova O.L. et al. Development of the composition of a liposomal dosage form of a hydrophobic derivative of indolocarbazole. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration* 2020;9(3):21–6. (In Russ.).
 21. Дмитриева М.В., Лугань Б., Полозкова А.П. и др. Выбор криопротектора для получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1269. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(1):74–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-74-79 Dmitrieva M.V., Lugen B., Polozkova A.P. et al. Selection of a cryoprotector for production a lyophilized liposomal dosage form of the indolocarbazole derivative LHS-1269. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(1):74–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-74-79

Вклад авторов

Е.В. Игнатова, И.В. Ярцева, З.С. Шпрах, А.П. Колпаксиди, М.В. Дмитриева, А.В. Ланцова, Л.Л. Николаева, И.Р. Просалкова: разработка эксперимента, анализ полученных данных, написание текста статьи и ее обсуждение.

Author's contribution

E.V. Ignatieva, I.V. Yartseva, Z.S. Shprakh, A.P. Kolpaksidi, M.V. Dmitrieva, A.V. Lantsova, L.L. Nikolaeva, I.R. Prosalkova: development of the experiment, analysis of the data obtained, writing the text of the article and its discussion.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.В. Игнатова / E.V. Ignatieva: <https://orcid.org/0000-0002-9200-4492>

И.В. Ярцева / I.V. Yartseva: <https://orcid.org/0000-0002-8818-7812>

З.С. Шпрах / Z.S. Shprakh: <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>
А.П. Колпаксиди / A.P. Kolpaksidi: <https://orcid.org/0000-0001-9388-1019>
М.В. Дмитриева / M.V. Dmitrieva: <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>
А.В. Ланцова / A.V. Lantsova: <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>
Л.Л. Николаева / L.L. Nikolaeva: <https://orcid.org/0000-0001-8003-8241>
И.Р. Просалкова / I.R. Prosalkova: <https://orcid.org/0000-0001-8367-7284>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-366.2022.3 «Создание инновационного отечественного лекарственного препарата из класса производных индолокразола, обладающего мультитаргетным противоопухолевым и антиангиогенным действием».

Funding. This work was financial supported by the grant of the President of the Russian Federation МК-366.2022.3 “Creation of an innovative domestic drug from the class of indolocarbazole derivatives with multi-target antitumor and antiangiogenic effect”.

Статья поступила: 19.07.2022. Принята к печати: 09.09.2022.
Article submitted: 19.07.2022. Accepted for publication: 09.09.2022.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-3-72-81>

Эффективность стерилизации пучком ускоренных электронов гидрогеля для 3D-культивирования мезенхимальных мультипотентных клеток

П.А. Быстров¹, К.М. Новрузов², М.П. Потапнев³, С.М. Космачева³, Н.Ю. Анисимова^{2, 4},
М.В. Киселевский^{2, 4}, П.С. Мышелова⁴, И.Н. Булыгина⁴, Ф.С. Сенатов⁴

¹ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН; Россия, 119071 Москва, Ленинский пр-т, 31, корп. 4;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

³ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий»; Беларусь, 220053 Минск, Долгиновский тракт, 160;

⁴ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-т, 4

Контакты: Керям Мурсали оглы Новрузов nkeryam@gmail.com

Введение. Гидрогели перспективны для использования в тканевой инженерии для восстановления и регенерации различных тканей, поскольку способны выполнять функции объемных скаффолдов, обеспечивая формирование 3D клеточных структур. Заселение таких скаффолдов аутологичными или гетерогенными мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками *in vitro* дает возможность локализовать эти клетки в области тканей-мишеней после имплантации пациенту. Одной из сложных задач является выбор способа и режима стерилизации гидрогеля, не изменяющих его свойства.

Цель исследования – изучение эффективности стерилизации гидрогеля пучком ускоренных электронов в различных режимах, изменения структуры и биосовместимости скаффолда для оценки перспектив его использования в медицинских целях, в том числе в качестве платформы для мезенхимальных стромальных клеток.

Материалы и методы. В работе использовали гидрогель на основе полисахаридов (4 % растворы альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы), сшитых хлоридом кальция, который был разработан, получен и предоставлен для наших исследований коллективом Научно-образовательного центра биомедицинской инженерии ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС». Образцы гидрогеля, нагруженные *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, были подвергнуты обработке пучком электронов в диапазоне 5–100 кГр. После электронно-лучевой обработки гидрогеля оценивали наличие живых микроорганизмов и изменение его структуры методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, а также фенотип мезенхимальных мультипотентных клеток и формирование ими 3D-структур.

Результаты. Было установлено, что режим обработки гидрогелей пучком электронов в режиме 25 кГр обеспечивает гибель микроорганизмов, не разрушая структуру гидрогеля, и не ингибирует способность формировать капиллярноподобные структуры мезенхимальными мультипотентными клетками.

Заключение. Обработка пучком ускоренных электронов в режиме 25 кГр может быть использована с целью стерилизации гидрогелей для получения объемных скаффолдов клеточно-инженерных имплантатов.

Ключевые слова: гидрогель, мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, стерилизация, пучок ускоренных электронов, скаффолд

Для цитирования: Быстров П.А., Новрузов К.М., Потапнев М.П. и др. Эффективность стерилизации пучком ускоренных электронов гидрогеля для 3D-культивирования мезенхимальных мультипотентных клеток. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):72–81. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-72-81

Efficiency of accelerated electron beam sterilization of a hydrogel for 3D cultivation of mesenchymal multipotent cells

Peter A. Bystrov¹, Keryam M. Novruzov², Mikhail P. Potapnev³, Svetlana M. Kosmacheva³, Natalia Yu. Anisimova^{2,4}, Mikhail V. Kiselevskiy^{2,4}, Polina S. Mysheleva⁴, Inna N. Bulygina⁴, Fedor S. Senatov⁴

¹A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences; Bld. 4, 31 Leninsky Ave., Moscow 119071, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

³Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies; 160 Dawhinawskiy Trakt, Minsk 220053, Belarus;

⁴National University of Science and Technology "MISIS"; 4 Leninsky Ave., Moscow 119049, Russia

Contacts: Keryam Mursali ogy Novruzov nkeryam@gmail.com

Background. Hydrogels are promising for use in tissue engineering for the restoration and regeneration of various tissues, since they are able to perform the functions of bulk scaffolds, providing the formation of 3D cell structures. Population of such scaffolds with autologous or heterogeneous mesenchymal multipotent stromal cells *in vitro* makes it possible to localize these cells in the area of target tissues after implantation in a patient. One of the difficult tasks is the choice of the method and mode of sterilization of the hydrogel, which does not change its properties.

Aim. Study of the effectiveness of hydrogel sterilization by an accelerated electron beam in various modes, changes in the structure and biocompatibility of the scaffold, to assess the prospects for its use for medical purposes, including as a platform for mesenchymal stromal cells.

Materials and methods. We used a hydrogel based on 4 % solutions of sodium alginate and sodium salt of carboxymethyl cellulose, cross-linked with calcium chloride, which was developed, obtained and provided for our research by the team of the Research and Educational Center for Biomedical Engineering of the National University of Science and Technology "MISIS". Hydrogel samples loaded with *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* were subjected to electron beam treatment in the range of 5–100 kGy. After electron beam treatment of hydrogel, the presence of living microorganisms and its structure were evaluated by IR-Fourier spectroscopy, as well as the phenotype and formation of 3D structures by mesenchymal multipotent cells.

Results. It was found that the treatment of hydrogels with an electron beam at a mode of 25 kGy ensures the death of microorganisms, but does not destroy the structure of the hydrogel and does not inhibit the ability to form capillary-like structures by mesenchymal multipotent cells.

Conclusion. Treatment with an accelerated electron beam at a 25 kGy can be used to sterilize hydrogels to obtain bulk scaffolds for cell engineering implants.

Keywords: hydrogel, mesenchymal multipotent stromal cells, sterilization, accelerated electron beam, scaffold

For citation: Bystrov P.A., Novruzov K.M., Potapnev M.P. et al. Efficiency of accelerated electron beam sterilization of a hydrogel for 3D cultivation of mesenchymal multipotent cells. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(3):72–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-72-81

Введение

Гидрогель (ГГ) является разновидностью полимерного полутвердого материала, который обладает хорошей биосовместимостью и способен впитывать большое количество воды. Из-за физического сходства ГГ с тканью человека они используются в качестве субстратов для клеточных культур и раневых повязок. С появлением и развитием тканевой инженерии ГГ стали использовать для восстановления и регенерации различных тканей и органов [1]. Мезенхимальные мультипотентные (стволовые) стромальные клетки (ММСК) применяют для регенерации тканей, лечения и профилактики цитокинового шторма при COVID-19 и реакции «трансплантат против хозяина», а также для стимуляции гемопоэза при аллогенной трансплантации стволовых гемопоэтических клеток [2–5]. В отличие от рутинного

культивирования использование ГГ позволяет создавать 3D-скаффолды, заселенные ММСК, что дает возможность локализовать эти клетки в области тканей-мишеней [6]. Более того, ГГ, дополненный ростовыми факторами, может значительно улучшить пролиферацию клеток в системе 3D-культивирования и обеспечить управляемую миграцию ММСК в целевую область [7]. 3D-культивирование ММСК способствует структурообразованию клеточной культуры и улучшает локальную перфузию тканей, что подтверждает перспективность использования ГГ в качестве скаффолда для локальной доставки ММСК и стимуляции ангиогенеза [8].

В настоящее время используется большое количество синтетических и природных полимеров, а также конструкций из них в качестве скаффолдов для клеточных культур. К перспективным направлениям

относится создание клеточных сфероидов ММСК, инкапсулированных в ГГ для локального введения, а также внесение в ГГ различных факторов, стимулирующих пролиферацию и хемотаксис стволовых клеток. В частности, одним из перспективных направлений является насыщение синтетических ГГ плазмой, обогащенной лизатом тромбоцитов (platelet rich plasma, PRP) – PRP-продуктом [9]. PRP-продукты содержат биоактивные компоненты, способствующие регенерации тканей [10]. Недавние работы описывают подходы к использованию PRP и гелей на ее основе для культивирования ММСК [11]. Полимерные системы доставки предназначены также для улучшения низкой растворимости некоторых биологически активных соединений, продления времени их циркуляции в крови и улучшения их биораспределения [12, 13]. Однако, несмотря на перспективы использования ГГ в медицине, для их широкого клинического применения еще предстоит решить ряд проблем.

Помимо эффективности и биосовместимости важным требованием к любому биоматериалу, предназначенному для внесения в организм, является микробиологическая безопасность, или стерильность. Эффективная стерилизация материалов имеет решающее значение для сведения к минимуму инфекционных осложнений, связанных с имплантируемыми медицинскими устройствами. Методы стерилизации имеют особо важное значение для комбинированных медицинских устройств, таких как системы доставки клеточных культур и лекарств, в которых необходимо уделять внимание целостности имплантата и таким факторам, как деградация/стабильность лекарства и жизнеспособность клеток, внесенных в него. Рутинные методы стерилизации, применяемые в медицинской практике, связанные с термическим или химическим воздействием, могут существенно изменить структуру и свойства ГГ, поэтому для их стерилизации чаще всего используют электронно-лучевые установки. R. Galante и соавт. [14] исследовали эффективность обработки ГГ гамма- и бета-излучением в диапазоне доз 2–100 кГр, при этом стерилизующий эффект отмечался при достижении дозы не ниже 25 кГр. Однако электронно-лучевая обработка может изменять свойства ГГ, такие как масса, форма, растворимость и структура, ухудшая его биологические свойства [15]. Несмотря на важность этой проблемы, из большого числа работ, посвященных изучению ГГ и перспектив их клинического использования, лишь менее 1 % публикаций освещают вопросы стерилизации этих полимерных материалов. Поэтому **целью исследования** стало изучение эффективности стерилизации ГГ пучком ускоренных электронов и влияния различных режимов облучения на его массу, структуру и биосовместимость для оценки перспектив

его использования в медицинских целях, в том числе в качестве платформы для ММСК.

Материалы и методы

Характеристика образцов. В работе использовали 50 образцов ГГ сферической формы диаметром 7 ± 2 мм на основе 4 % растворов альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, сшитых хлоридом кальция, которые были предоставлены для наших исследований коллективом Научно-образовательного центра биомедицинской инженерии ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС». В литературе описаны получение, структура и свойства ГГ медицинского назначения на основе альгината натрия и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы [16, 17].

Определение активности живых микроорганизмов и их способности к делению после облучения пучком ускоренных электронов. В качестве модельных микроорганизмов использовали 20–48-часовые культуры грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (*E. coli*), грамположительных неспорообразующих бактерий *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) и дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (коллекция ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). Инокуляты модельных культур микроорганизмов ресуспендировали в жидкой питательной среде: *S. cerevisiae* в бульоне Сабуро (концентрация $3,6 \times 10^6$ клеток/мл), *E. coli* и *L. acidophilus* в триптозносоевом бульоне (все среды: Pronadisa, Испания). С целью подготовки для исследования образцы ГГ промывали в стерильном растворе Хенкса («ПанЭко», Россия), а затем на каждый образец наносили по 50 мкл суспензии микроорганизмов (СМ). Для оценки исходного уровня жизнеспособности микроорганизмов 50 мкл СМ вносили в 500 мкл мясо-пептонного бульона (МПБ) (Pronadisa, Испания).

Подготовленные образцы ГГ с нанесенными микроорганизмами (СМ + ГГ) помещали по одному в пластиковые центрифужные пробирки объемом 2 мл. В отдельных сериях в пробирки помещали образцы промытого ГГ без микроорганизмов (только ГГ) или только СМ в объеме 50 мкл. Затем во все пробирки вносили по 500 мкл МПБ. Не позднее чем через 3 ч после приготовления дублированные образцы ГГ, СМ, СМ + ГГ были подвергнуты облучению в компактной радиационно-технологической установке при различных режимах обработки (5, 10, 25, 50, 100 кГр), как было описано нами ранее [18]. После обработки образцов для оценки бактерицидного эффекта тестировали наличие живых микроорганизмов в каждом образце, а также определяли их способность к росту (делению клеток) в тестах на бактериостатическую активность. В качестве контроля использовали образцы,

не подвергавшиеся воздействию электронного пучка (режим 0 кГр).

Для оценки воздействия изучаемых физических факторов на жизнеспособность дрожжей использовали клеточный анализатор Luna (Logos Biosystems, Корея). Для определения жизнеспособности бактерий использовали метод культивирования в присутствии красителя AlamarBlue (Invitrogen, США) с последующей оценкой флуоресценции при 530 Ex/590 Em в триплетах на планшетном ридере Spark (Tecan, Швейцария). Результат воздействия обработки пучком электронов на жизнеспособность дрожжей рассчитывали как процентное отношение величин флуоресценции в пробах ГГ, СМ, СМ + ГГ к исходному уровню.

Для оценки воздействия изучаемых физических факторов на способность микроорганизмов к делению тестируемые образцы после обработки пучком электронов помещали в 500 мкл МПБ и инкубировали в течение 1 сут при 20 °C (*S. cerevisiae*) или 37 °C (*E. coli* и *L. acidophilus*) в атмосфере 5 % CO₂. Для учета результата проводили оценку абсорбции в триплетах при 540 нм против 690 нм на приборе Spark (Tecan, Швейцария). Отдельно учитывали абсорбцию в лунках, содержащих только 500 мкл МПБ. Результат рассчитывали по формуле:

$$\text{Рост культуры, \%} = \frac{A_o - A_{\text{МПБ}}}{A_k - A_{\text{МПБ}}} \times 100,$$

где A_o — абсорбция в образце, A_k — абсорбция в контроле, $A_{\text{МПБ}}$ — абсорбция в МПБ.

Инфракрасная (ИК) спектроскопия с преобразованием Фурье (ИК-Фурье-спектроскопия). Для изучения влияния различных режимов стерилизации на изменение химических связей ГГ был выполнен анализ образцов методом нарушенного полного внутреннего отражения в ИК-области. Исследование проводили на ИК-спектрометре Nicolet 380 (Thermo Scientific, США) в диапазоне от 4000 до 750 см⁻¹ при комнатной температуре. Данный метод позволяет судить о деградации ГГ с помощью мониторинга изменений по результирующим пикам, которые соответствуют определенным функциональным группам.

Биосовместимость. Для оценки биосовместимости изучали уровень индуцированного гемолиза и цитотоксичности в соответствии с методиками, изложенными ранее [15]. С этой целью образцы ГГ по одному инкубировали с суспензией эритроцитов и лейкоцитов крови здорового донора, предварительно оценив базовый уровень жизнеспособности и гемолиза в клеточных суспензиях. Длительность инкубации составила 2 и 24 ч. В качестве контроля использовали клетки, которые инкубировали при отсутствии ГГ в анало-

гичных условиях. Результат исследований рассчитывали как отношение измеренной величины гемолиза или цитотоксичности в конце периода инкубации к исходным уровням указанных параметров. ГГ рассматривали как биосовместимый в случае отсутствия достоверных отличий клеточной реактивности в лунках с ГГ и в контроле.

Изучение 3D-культивирования ММСК в ГГ. Генерацию культуры ММСК из костного мозга здоровых собак породы бигль для изучения 3D-культивирования на модели объемного скаффолда проводили в соответствии с методикой, изложенной ранее [19]. С этой целью охлажденный до +4 °C матригель (Matrigel Basement Membrane Matrix, Corning, США) смешивали с полной питательной средой в соотношении 1:1 на льду и разливали по 1 мл в лунки охлажденного 24-луночного планшета (Nunc, ThermoFisher Scientific, США). ММСК были деадгезированы трипсином, затем отмыты RPMI-1640, ресуспендированы в полной питательной среде и внесены в лунки с матригелем в концентрации $3,2\text{--}4,4 \times 10^4$ клеток/мл. Инкубацию клеток осуществляли при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 12 сут. Для оценки особенностей структурообразования ММСК были изучены морфологические особенности роста культуры по результатам световой микроскопии после окрашивания клеток гематоксилином и эозином («ПанЭко», Россия). Для определения концентрации делящихся клеток оценивали уровень ММСК, маркированных Ki-67, с помощью набора Muse® Ki67 Proliferation Kit (EMD Millipore Corp., Германия) и клеточного анализатора Muse (EMD Millipore Corp., Германия). Для оценки фенотипа использовали антитела против CD11c, CD11b, CD62 (BD Bioscience, США). Уровень экспрессии клетками данных молекул определяли на проточном цитометре ACEA Novocyte (Bioscience Inc., США).

Статистический анализ данных. Для описания результатов измерений в отдельных группах рассчитывали среднее значение и стандартную девиацию. Для проведения сравнительного анализа воздействия различных режимов физических факторов относительно контроля использовали тесты χ^2 . Отличия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Определение активности живых микроорганизмов после облучения пучком ускоренных электронов. На 1-м этапе работы были оценены антибактериальная и антифунгицидная активность облучения в диапазоне воздействующих доз от 5 до 100 кГр (рис. 1).

Как видно из рис. 1, а, наблюдалось достоверное снижение концентрации живых дрожжевых клеток в СМ под воздействием обработки пучком ускоренных электронов при всех режимах (от 5 до 100 кГр) в сравнении с контролем. Максимальный эффект (44 %) в

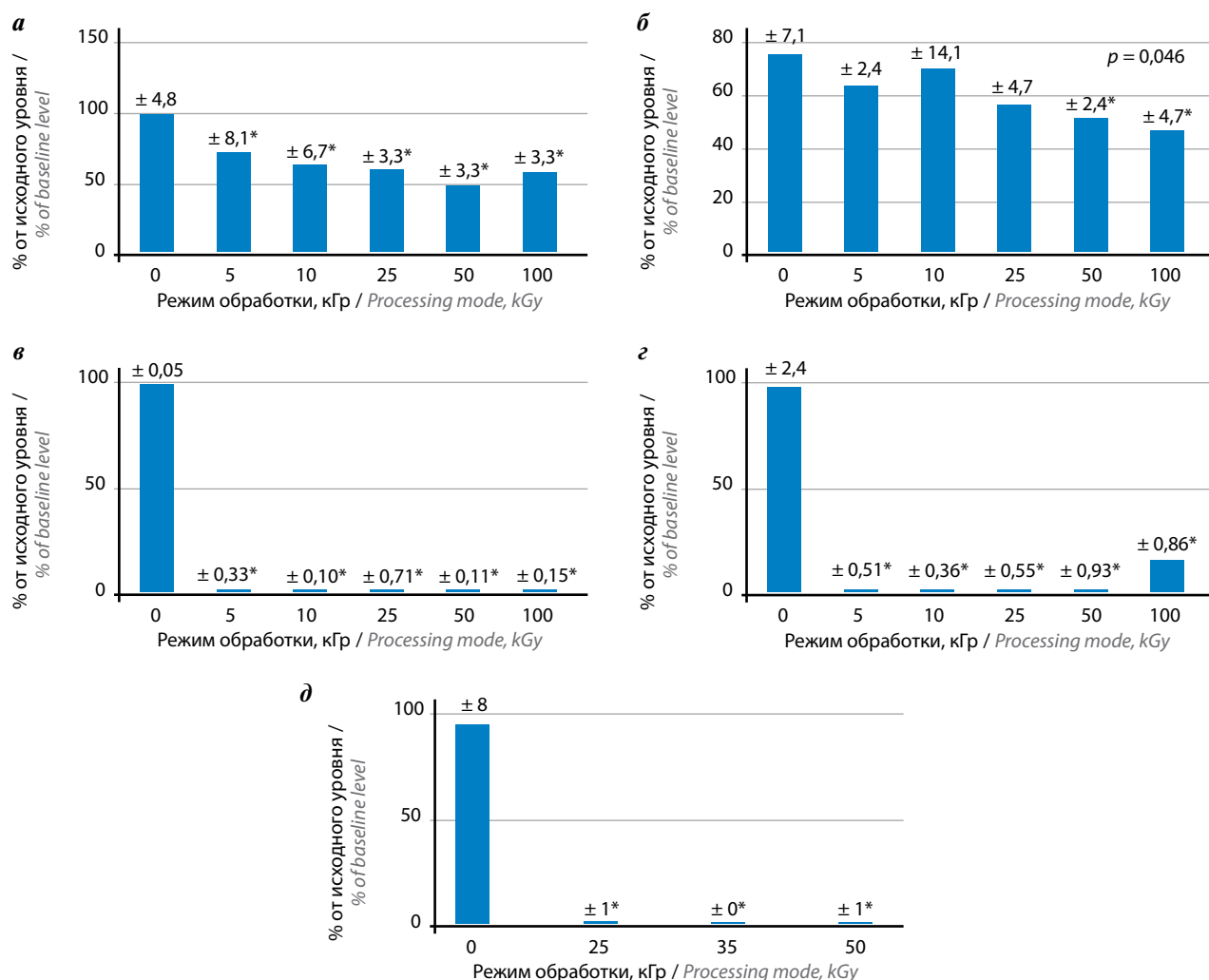


Рис. 1. Результаты оценки выживаемости дрожжей *S. cerevisiae* в суспензии (а) и на образцах гидрогеля (б); грамотрицательных бактерий *E. coli* в суспензии (в) и на образцах гидрогеля (г); грамположительных неспорообразующих бактерий *L. acidophilus* (д) после обработки пучком ускоренных электронов в различных режимах относительно исходного уровня жизнеспособности. Контроль — режим обработки 0 кГр. *Достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$)

Fig. 1. Results of evaluating the survival rate of yeast *S. cerevisiae* in suspension (а) and on hydrogel samples (б); gram-negative bacteria *E. coli* in suspension (в) and on hydrogel samples (г); gram-positive non-spore-forming bacteria *L. acidophilus* (д) after treatment with an electron beam in various modes relative to the initial level of viability. Control — processing mode 0 kGy. *Differences from the control are significant ($p < 0.05$)

отмечен после применения режимов 50–100 кГр. Эффект обработки пучком ускоренных электронов образцов ГГ с нанесенными дрожжами (СМ + ГГ) был сходным (см. рис. 1, б). Достоверный фунгицидный эффект (46–51 % относительно исходного уровня) наблюдали только в результате применения режимов 50–100 кГр. Использование режима 25 кГр обеспечивало гибель в среднем 41 % дрожжей. Значительно более выраженный антимикробный эффект изучаемого метода обработки был обнаружен на модели *E. coli* (см. рис. 1 в, г). Так, было установлено, что применение всех использованных режимов приводило к достоверному угнетению жизнеспособности бактерий как в суспензии, так и на образцах ГГ (гибель 95–100 % относительно исходного уровня). На модели

грамположительных бактерий *L. acidophilus* было показано, что полная гибель этих микроорганизмов на ГГ происходила при использовании режимов 25–50 кГр (см. рис. 1, д).

Исследование способности микроорганизмов к делению после облучения. Согласно приведенным выше результатам, воздействие пучка ускоренных электронов не обеспечивало немедленной гибели дрожжей. Для проверки гипотезы о том, что изучаемый метод все же перспективен для стерилизации ГГ, в специальной серии экспериментов исследовали его способность подавлять деление микроорганизмов, предотвращая рост культуры (т.е. фунгио-/бактериостатический эффект оказанного воздействия). А именно оценили подавление роста культуры микроорганизмов,

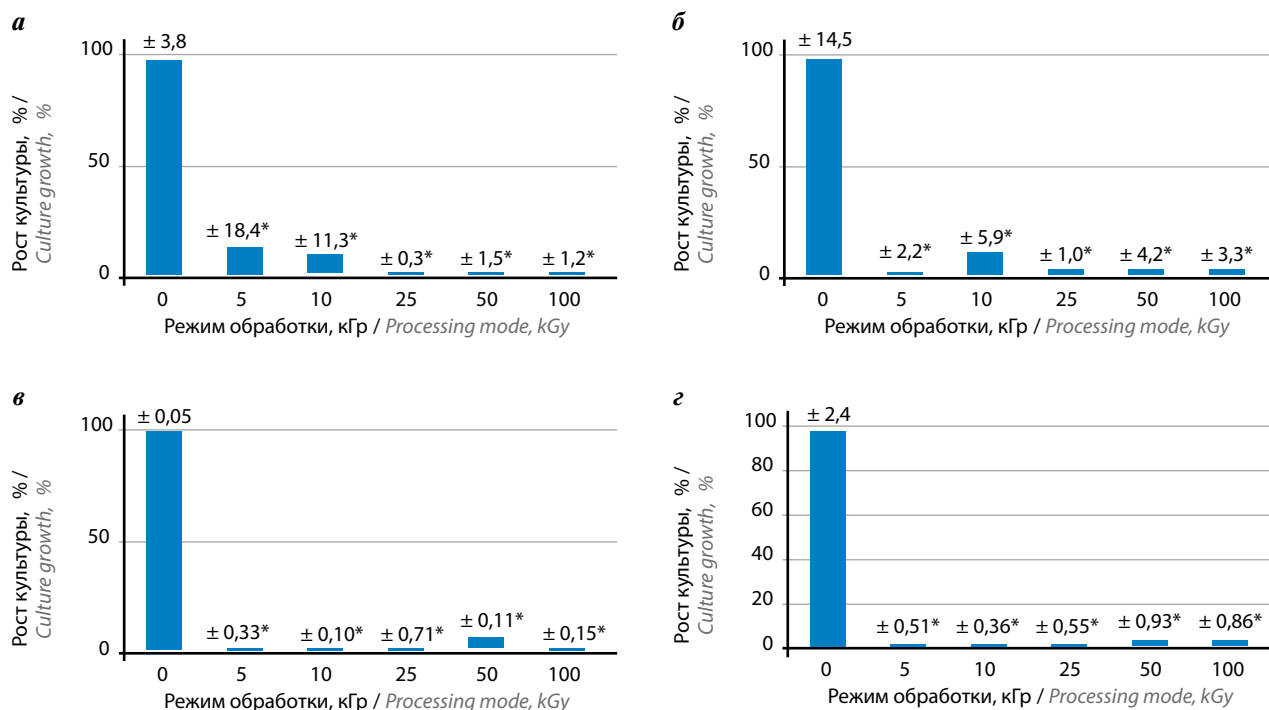


Рис. 2. Оценка подавления роста культуры микроорганизмов через 1 сут после электронно-лучевой обработки пучком ускоренных электронов в режимах 5–100 кГр: дрожжей *S. cerevisiae* в суспензии (а) и на образцах гидрогеля (б); бактерий *E. coli* в суспензии (в) и на образцах гидрогеля (г). Контроль – режим обработки 0 кГр. *Достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$)

Fig. 2. Evaluation of inhibition/suppression of the microorganisms division 1 day after electron beam treatment with accelerated electrons in modes 5–100 kGy: of yeasts *S. cerevisiae* in suspension (a) and on hydrogel samples (б), as well as *E. coli* bacteria in suspension (в) and on hydrogel samples (г). Control – processing mode 0 kGy. *Differences from the control are significant ($p < 0.05$)

опосредованного их способностью к делению, через 1 сут после обработки пучком ускоренных электронов (рис. 2).

Представленные данные показывают, что обработка пучком ускоренных электронов во всех использованных режимах приводила к достоверному угнетению жизнеспособности микроорганизмов. При использовании режимов 25, 50 и 100 кГр стерилизующий эффект достигал 99 %.

ИК-Фурье-спектроскопия образцов ГГ при облучении пучком ускоренных электронов. Приведенные выше результаты позволили выявить эффективные режимы обработки ГГ для его стерилизации. Однако данный подход представляет интерес для практического использования только в том случае, если результатом воздействия на ГГ не становится изменение его физических свойств, влияющих на эксплуатационные характеристики материала. В связи с этим в специальной серии экспериментов было исследовано влияние электронно-лучевой обработки в режимах в диапазоне от 25 до 50 кГр: изучено изменение химических связей в образцах с помощью ИК-Фурье-спектроскопии методом нарушенного полного внутреннего отражения.

Полученные данные свидетельствуют о том, что применение режимов обработки 25 кГр и менее не из-

меняло структуру ГГ (рис. 3). Однако после стерилизации исследуемых образцов в режиме 35 кГр наблюдали снижение интенсивности пиков в диапазоне от 1500 до 1000 см^{-1} , которые почти полностью исчезли после обработки 50 кГр, что свидетельствует о разрушении структуры ГГ.

На основании анализа полученных результатов был сделан вывод, что наиболее предпочтительным режимом для стерилизации ГГ методом электронно-лучевой обработки пучком ускоренных электронов является 25 кГр.

Биосовместимость гидрогелей. Представленные выше результаты позволили определить эффективный режим стерилизации ГГ пучком электронов, не приводящий к достоверным изменениям его свойств. Это обеспечило возможность использования ГГ данного типа в медицинских целях при условии его биосовместимости. Примером такой цели может быть получение объемного скаффолда, предназначенного для локального внесения клеток, колонизировавших его *ex vivo*. Для оценки перспективности применения тестируемого ГГ в качестве объемного скаффолда для целевой имплантации клеток мы исследовали индукцию гемолиза изучаемыми образцами ГГ, а также цитотоксичность в отношении лейкоцитов крови после 2 и 24 ч инкубации. С этой целью

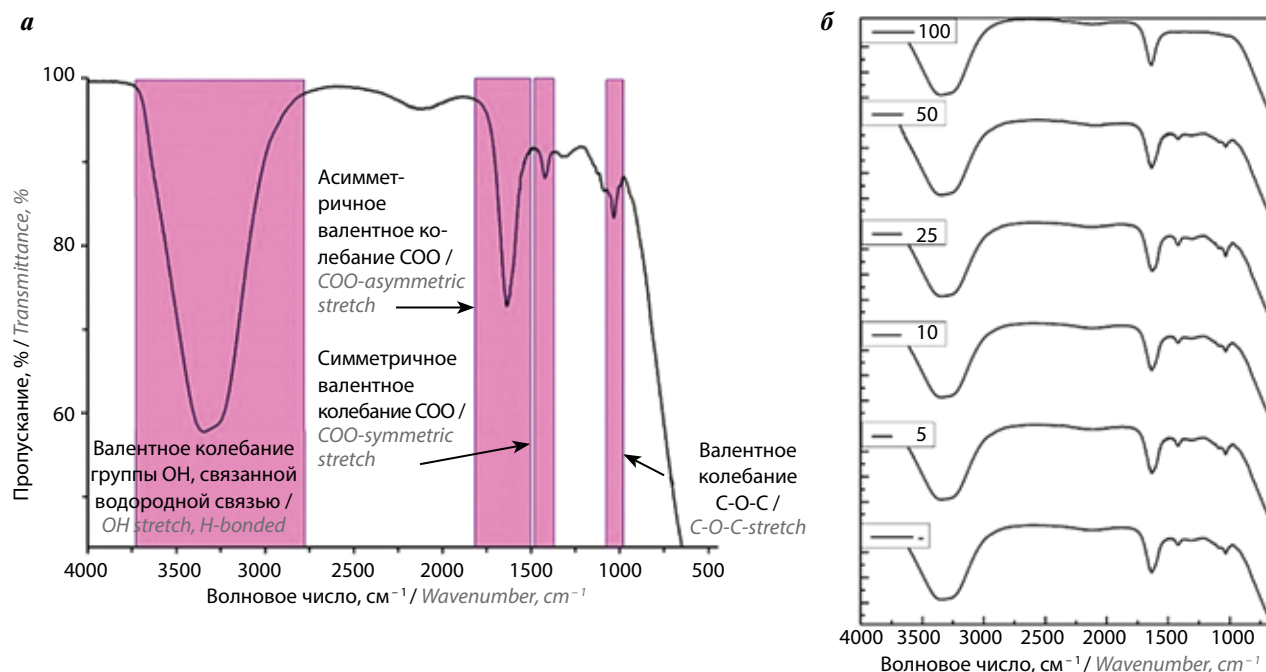


Рис. 3. Инфракрасный спектр образцов гидрогеля до (а) и после (б) электронно-лучевой обработки пучком ускоренных электронов
Fig. 3. Infrared spectrum of hydrogel samples before (a) and after (b) electron beam processing with an accelerated electron beam

ГГ обрабатывали пучком электронов в режиме 25 кГр. Результаты проведенных экспериментов представлены на рис. 4.

Полученные данные показали отсутствие достоверного воздействия ГГ на выживаемость клеток и гемолиз (при сравнительном межгрупповом анализе $p < 0,05$). Следовательно, изучаемый ГГ после стерилизации в режиме 25 кГр соответствует критериям биосовместимости. Таким образом, полученные результаты подтверждают возможность использования ГГ после обработки предлагаемым способом в качестве платформы, или скаффолда, для заселения клетками.

3D-культивирование ММСК в ГГ. ММСК получали из аспирата костного мозга собак. Полученные после культивирования клетки характеризовались следующим фенотипом: CD34⁻CD45⁻CD105^{high+}CD90^{high+}CD11c^{high+}CD11b⁺CD95^{low+} (что позволило идентифицировать их как ММСК). ММСК заселяли в образцы ГГ (модель пространственного скаффолда для 3D-культивирования), а также на дно лунок планшета (модель 2D-культивирования) и оценивали их пролиферативную активность, а также фенотип через 12 сут инкубации.

Рис. 5 демонстрирует, что в условиях 3D-культивирования образуются циркулярные структуры, формирующие в толще гидрогеля капилляроподобную сеть.

Для изучения пролиферативной активности ММСК в ГГ была оценена экспрессия внутриклеточ-

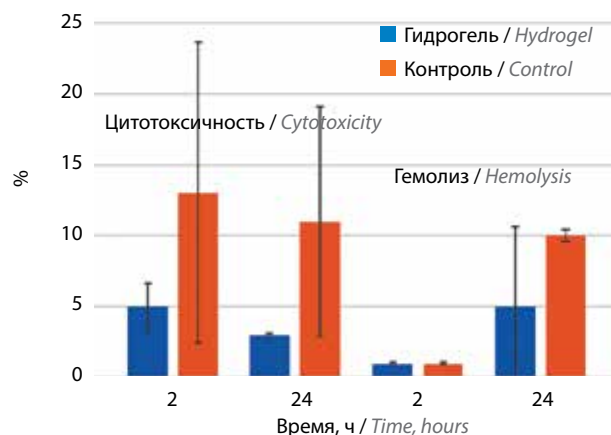


Рис. 4. Сравнительный анализ цитотоксичности и гемолиза, индуцированных гидрогелем, в сравнении с контролем (инкубация клеток при отсутствии гидрогеля в аналогичных условиях)

Fig. 4. Comparative analysis of cytotoxicity and hemolysis induced by hydrogel compared with the control (incubation of cells in the absence of hydrogel under similar conditions)

ного белка Ki-67. Установлено, что инкубация в гидрогелевом скаффолде достоверно не влияла на количество Ki-67⁺-клеток ($22 \pm 3,5$ % при 2D-культивировании и $27 \pm 1,7$ % при 3D-культивировании в ГГ). Изучение фенотипа ММСК в различных моделях культивирования также не позволило выявить угнетающего воздействия ГГ на экспрессию клетками молекул адгезии в условиях 3D-культивирования (см. таблицу).

Экспрессия мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками (ММСК) молекул адгезии и маркеров пролиферации после инкубации в гидрогеле

Mesenchymal multipotent stromal cells (MMSC) expression of adhesion molecules and proliferation markers after incubation in hydrogel

Модель культивирования Cultivation mode	Образцы ММСК MMSC samples		
	CD11c	CD11b	CD62
В гидрогеле после облучения (3D-культивирование), % In the hydrogel after irradiation (3D cultivation), %	83 ± 4,6	92 ± 1,5	76 ± 2,3
Контроль (2D-культивирование), % Control (2D cultivation), %	81 ± 4,1	95 ± 2,6	77 ± 4,4
<i>p</i>	0,376	0,248	0,414

Закключение

Полученные результаты позволяют прийти к заключению, что обработка пучком ускоренных электронов обладает бактерицидной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий использованных модельных штаммов. В частности, было установлено, что обработка пучком ускоренных электронов предотвращала деление клеток и снижала жизнеспособность бактериальной культуры на 95–100 % как в суспензии, так и при контаминации образцов ГГ.

Воздействие пучка ускоренных электронов обладало более слабым эффектом в отношении одноклеточных дрожжевых грибов вида *S. cerevisiae*. Так, было обнаружено, что только самые жесткие режимы обработки – 50 и 100 кГр – способствуют достоверной гибели клеток. Однако обработка пучком ускоренных электронов на всех режимах повреждает клеточные структуры, предотвращая возможность пролиферации микроорганизмов, что проявляется подавлением роста и последующей гибелью микробной культуры. Учитывая вышеизложенное, можно констатировать, что экспериментальный метод обработки способствовал деконтаминации ГГ от бактерий на всех режимах, тогда как его применение даже в самых жестких дозах гарантировало только частичное снижение количества живых дрожжевых клеток к концу обработки. Однако повреждения дрожжевых клеток, вероятно,

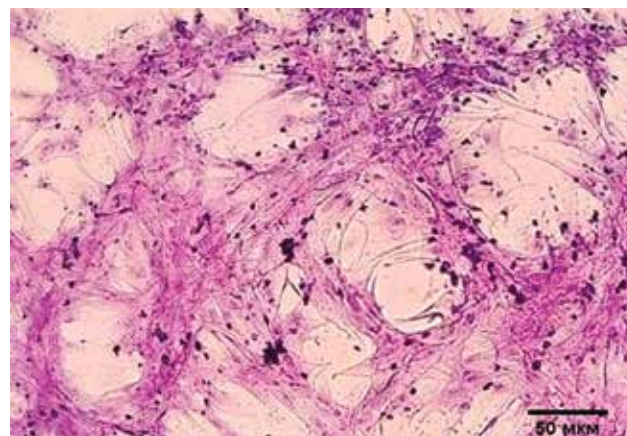


Рис. 5. Структурирование культуры мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток в модели пространственного скаффолда для 3D-культивирования на 12-е сутки инкубации. Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Fig. 5. Structuring of mesenchymal multipotent stromal cells culture in a spatial scaffold model for 3D cultivation on the 12th day of incubation. Hematoxylin and eosin staining, ×400

были настолько значительны, что это приводило к подавлению клеточного деления и в конечном счете к отсроченной гибели дрожжевой культуры. Таким образом, обработка пучком ускоренных электронов на всех испытанных режимах ингибировала колониеобразование как бактерий, так и дрожжей, т. е. демонстрировала бактериостатический и фунгиостатический эффект.

Проведенные исследования показали, что предложенный режим обработки ГГ пучком ускоренных электронов в дозе 25 кГр оказывает микробицидное воздействие, не вызывая разрушающего воздействия на структуру ГГ, не влияя на пролиферативный потенциал и способность формировать капиллярноподобные структуры ММСК. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, показавших, что оптимальным стерилизующим режимом для гидрогелей является облучение электронным пучком (в пределах 25–100 кГр). Следовательно, обработка в указанном режиме может применяться для стерилизации ГГ с целью их использования для разработки новых продуктов медицинского назначения, в том числе скаффолдов, колонизированных клеточными культурами, что принципиально важно для обеспечения васкуляризации биоинженерной конструкции после имплантации в ткани организма.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Li Z., Chen Z., Chen H. et al. Polyphenol-based hydrogels: pyramid evolution from crosslinked structures to biomedical applications and the reverse design. *Bioact Mater* 2022;17:49–70. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.01.038
- Santamaria G., Brandi E., Vitola P. et al. Intranasal delivery of mesenchymal stem cell secretome repairs the brain of Alzheimer's mice. *Cell Death Differ* 2021;28(1):203–18. DOI: 10.1038/s41418-020-0592-2
- Sultan M.T., Choi B.Y., Ajiteru O. et al. Reinforced-hydrogel encapsulated hMSCs towards brain injury treatment by trans-septal approach. *Biomaterials* 2021;266:120413. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120413
- Kiselevskiy M.V., Vlasenko R.Y., Stepanyan N.G. et al. Secretome of mesenchymal bone marrow stem cells: is it immunosuppressive or proinflammatory? *Bull Exp Biol Med* 2021;172(2):250–3. DOI: 10.1007/s10517-021-05371-5
- Kiselevskiy M., Vlasenko R., Reshetnikova V. et al. Potential use of mesenchymal multipotent cells for hemopoietic stem cell transplantation: pro and contra. *J Pediatr Hematol Oncol* 2021;43(3):90–4. DOI: 10.1097/MPH.0000000000002065
- Kakudo N., Morimoto N., Ma Y., Kusumoto K. Differences between the proliferative effects of human platelet lysate and fetal bovine serum on human adipose-derived stem cells. *Cells* 2019;8(10):1218. DOI: 10.3390/cells8101218
- Kirsch M., Rach J., Handke W. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cell cultivation in fetal calf serum, human serum, and platelet lysate in 2D and 3D systems. *Front Bioeng Biotechnol* 2021;8:598389. DOI: 10.3389/fbioe.2020.598389
- Shanbhag S., Rashad A., Nymark E.H. et al. Spheroid coculture of human gingiva-derived progenitor cells with endothelial cells in modified platelet lysate hydrogel. *Front Bioeng Biotechnol* 2021;9:739225. DOI: 10.3389/fbioe.2021.739225
- Chahal A.S., Gomez-Florit M., Domingues R.M.A. et al. Human platelet lysate-loaded poly(ethylene glycol) hydrogel induce stem cell chemotaxis *in vitro*. *Biomacromolecules* 2021;22(8):3486–96. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c00573
- Ясюкевич А.С., Загородный Г.М., Потاپнев М.П. и др. Показатели, безопасность, результаты клинического использования аутологичной плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, и дальнейшие перспективы ее изучения. *Прикладная спортивная наука* 2021;1(13):100–9. Yasyukevich A.S., Zagorodny G.M., Potapnev M.P. et al. Indications, safety, results of clinical use of autologous plasma enriched with soluble platelet factors, and further prospects for its study. *Prikladnaya sportivnaya nauka = Applied sports science* 2021;1(13):100–9. (In Russ.).
- Gallego M., López C., Carmona J.U. Carmon Evaluation of the pro-, anti-inflammatory, and anabolic effects of autologous platelet-rich gel supernatants in an *in vitro* coculture system of canine osteoarthritis. *Vet Med Int* 2022;2022:3377680. DOI: 10.1155/2022/3377680
- Lei T., Liu Y., Deng S. et al. Hydrogel supplemented with human platelet lysate enhances multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells. *J Nanobiotechnology* 2022;20(1):176. DOI: 10.1186/s12951-022-01387-9
- Senatov F., Anisimova N., Kiselevskiy M. et al. Polyhydroxybutyrate/hydroxyapatite highly porous scaffold for small bone defects replacement in the nonload-bearing parts. *J Bionic Eng* 2017;14(4): 648–58. DOI: 10.1016/S1672-6529(16)60431-6
- Galante R., Pinto T.J.A., Colaço R., Serro A.P. Sterilization of hydrogels for biomedical applications: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018;106(6):2472–92. DOI: 10.1002/jbm.b.34048
- Sedlacek O., Kucka J., Monnery B.D. et al. The effect of ionizing radiation on biocompatible polymers: from sterilization to radiolysis and hydrogel formation. *Polym Degrad Stab* 2017;137:1–10. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.005
- Zhang K., Wang Y., Wei Q. et al. Design and fabrication of sodium alginate/carboxymethyl cellulose sodium blend hydrogel for artificial skin. *Gels* 2021;7(3):115. DOI: 10.3390/gels7030115
- Osidak E.O., Karalkin P.A., Osidak M.S. et al. Viscoll collagen solution as a novel bioink for direct 3D bioprinting. *J Mater Sci Mater Med* 2019;30(3):31. DOI: 10.1007/s10856-019-6233-y
- Pavlov Yu.S., Bystrov P.A. Software and hardware complex for radiation processing facility control. *Radiat Phys Chem* 2022;196:110110. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2022.110110
- Choudhary R., Venkatraman S.K., Bulygina I. et al. Biomineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;118:111456. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111456

Вклад авторов

П.А. Быстров: отработка методики и проведение электронно-лучевой обработки гидрогелей, написание и редактирование текста статьи;

К.М. Новрузов: проведение исследований для получения данных, статистический анализ данных, написание и редактирование текста статьи;

М.П. Потاپнев: разработка дизайна экспериментов по изучению биоактивных свойств гидрогеля;

С.М. Космачева: обзор публикаций по теме статьи, анализ данных о колонизации гидрогеля мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками;

Н.Ю. Анисимова: проведение исследований для получения данных, интерпретация полученных результатов, написание и редактирование текста статьи;

М.В. Киселевский: обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследований биологических свойств гидрогеля;

П.С. Мышелова, И.Н. Булыгина, Ф.С. Сенатов: характеристика гидрогеля и исследование его физических свойств методом ИК-Фурье.

Author's contribution

P.A. Bystrov: development of the methodology for electron beam processing of hydrogels, article writing and editing;

K.M. Novruzov: conducting research to obtain data, statistical analysis of data, article writing and editing;

M.P. Potapnev: development of the design of experiments to study the bioactive properties of the hydrogel;

S.M. Kosmacheva: review of publications on the topic of the article, analysis of data on the colonization of the hydrogel by mesenchymal multipotent stromal cells;

N.Yu. Anisimova: conducting research to obtain data, interpreting the results, article writing and editing;

M.V. Kiselevskiy: review of publications on the topic of the article, development of the design of studies of the biological properties of the hydrogel;

P.S. Myshelova, I.N. Bulygina, F.S. Senatov: characterization of the hydrogel and the study of its physical properties by the IR-Fourier method.

ORCID авторов / ORCID of authors

П.А. Быстров / P.A. Bystrov: <https://orcid.org/0000-0001-8453-5739>
К.М. Новрузов / K.M. Novruzov: <https://orcid.org/0000-0002-0773-255X>
М.П. Потапнев / M.P. Potapnev: <https://orcid.org/0000-0001-7705-9383>
Н.Ю. Анисимова / N.Yu. Anisimova: <https://orcid.org/0000-0002-4370-6578>
М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>
Ф.С. Сенатов / F.S. Senatov: <https://orcid.org/0000-0003-3907-5344>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030».
Funding. The study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the strategic academic leadership program “Priority 2030”.

Статья поступила: 13.04.2022. Принята к публикации: 31.08.2022.
Article submitted: 13.04.2022. Accepted for publication: 31.08.2022.

Сравнение Ридостина Про и Poly(I:C) в качестве адъюванта для противоопухолевой неоантигенной пептидной вакцины

М.А. Барышникова¹, А.В. Пономарев¹, А.А. Рудакова¹, З.А. Соколова¹, Н.В. Голубцова¹, П.В. Царапаев¹, Г.М. Левагина², Е.Д. Даниленко², В.С. Косоруков¹

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

²Институт медицинской биотехнологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Россия, 630010 Новосибирская область, Бердск, ул. Химзаводская, 9

Контакты: Александр Васильевич Пономарев kl8546@yandex.ru

Введение. Эффективность противоопухолевых неоантигенных пептидных вакцин зависит от наличия в их составе адъюванта. Poly(I:C), агонист TLR-3, в качестве адъюванта применяется в мышиных моделях противоопухолевых вакцин, но имеет ограничения для применения у людей. Поэтому актуален поиск новых эффективных адъювантов для включения в состав противоопухолевой неоантигенной пептидной вакцины. Ридостин Про – отечественный препарат, который содержит природный комплекс натриевых солей двуспиральных и односпиральных рибонуклеиновых кислот, является агонистом TLR-3, индуктором интерферона; показана его противовирусная активность. В связи с этим представляет интерес исследование Ридостина Про в качестве адъюванта в составе пептидных неоантигенных вакцин.

Цель исследования – оценить способность адъювантов Ридостин Про и Poly(I:C) усиливать специфический Т-клеточный ответ на неоантигенные синтетические пептиды; определить противоопухолевую эффективность неоантигенной пептидной вакцины с адъювантами Ридостин Про или Poly(I:C).

Материалы и методы. Иммуногенность пептидов после вакцинации с адъювантами Ридостин Про или Poly(I:C) определяли с помощью метода ELISpot. Противоопухолевый эффект адъювантов Ридостин Про или Poly(I:C) оценивали на мышиной модели опухоли B16-F10 по влиянию на скорость роста опухоли и выживаемость мышей.

Результаты. Вакцинация мышей Ридостином Про или Poly(I:C) с неоантигенными пептидами способствовала появлению специфического иммунного ответа к пептидам, входившим в состав вакцины. Ридостин Про и в составе модели вакцины, и при введении без пептида тормозит рост опухоли и увеличивает продолжительность жизни мышей с меланомой B16-F10.

Заключение. Ридостин Про способствует формированию специфического иммунного ответа на пептидную вакцину, усиливает ее противоопухолевый эффект. Эти результаты подтверждают, что Ридостин Про может оказаться эффективным адъювантом для персонализированных неоантигенных пептидных вакцин.

Ключевые слова: Poly(I:C), Ридостин Про, неоантигенная пептидная вакцина, B16-F10

Для цитирования: Барышникова М.А., Пономарев А.В., Рудакова А.А. и др. Сравнение Ридостина Про и Poly(I:C) в качестве адъюванта для противоопухолевой неоантигенной пептидной вакцины. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(3):82–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-82-89

Comparison of Ridostin Pro and Poly(I:C) as adjuvant for a cancer neoantigen peptide vaccine

Maria A. Baryshnikova¹, Alexander V. Ponomarev¹, Anna A. Rudakova¹, Zinaida A. Sokolova¹, Natalya V. Golubtsova¹, Pavel V. Tsarapaev¹, Galina M. Levagina², Elena D. Danilenko², Vyacheslav S. Kosorukov¹

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

²Institute of Medical Biotechnology of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vektor”; 9 Khimzavodskaya St., Berdsk, Novosibirsk region 630010, Russia

Contacts: Alexander Vasilievich Ponomarev kl8546@yandex.ru

Background. The effectiveness of cancer neoantigen peptide vaccines depends on the presence of an adjuvant in their composition. Poly(I:C), a TLR-3 agonist, is used as an adjuvant in mouse models of cancer vaccines, but has limitations for use in humans. Therefore, the search for new effective adjuvants for inclusion in the composition of cancer neoantigen peptide vaccine is relevant. Ridostin Pro is a domestic drug that contains a natural complex of sodium salts of double-chiral and single-chiral ribonucleic acids, is an agonist of TLR-3, an inducer of interferon, its antiviral activity is shown. In this regard, the study of Ridostin Pro as an adjuvant in the composition of neoantigen peptide vaccines is of interest.

Aim. To evaluate the ability of Ridostin Pro and Poly(I:C) adjuvants enhance the specific T-cell response to neoantigen synthetic peptides; to study the antitumor efficacy of a neoantigen peptide vaccine with Ridostin Pro or Poly(I:C) adjuvants.

Materials and methods. Immunogenicity of peptides after vaccination with Ridostin Pro or Poly(I:C) adjuvants evaluated with ELISpot. Antitumor effect of Ridostin Pro or Poly(I:C) adjuvants were evaluated on a mouse model of the B16-F10 tumor by the effect on the tumor growth rate and survival of mice.

Results. Vaccination of mice with Ridostin Pro or Poly(I:C) with neoantigen peptides contributed to the appearance of a specific immune response to peptides that were part of the vaccine. Ridostin Pro, both as part of a vaccine model and when administered without a peptide, inhibits tumor growth and increases the life expectancy of mice with melanoma B16-F10.

Conclusion. Ridostin Pro promotes the formation of a specific immune response to the peptide vaccine, enhances the antitumor effect of the vaccine. These results confirm that Ridostin Pro may prove to be an effective adjuvant for personalized neoantigen peptide vaccines.

Keywords: Poly(I:C), Ridostin Pro, neoantigen peptide vaccine, B16-F10

For citation: Baryshnikova M.A., Ponomarev A.V., Rudakova A.A. et al. Comparison of Ridostin Pro and Poly(I:C) as adjuvant for a cancer neoantigen peptide vaccine. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2022;21(3):82–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-3-82-89

Введение

Противоопухолевая вакциноterapia пептидными неоантигенными вакцинами направлена на индукцию или активацию Т-клеток, специфически распознающих и уничтожающих опухолевые клетки, а также на установление долговременной иммунологической памяти [1]. Однако для усиления действия противоопухолевых вакцин требуются эффективные адъюванты, и большие надежды возлагаются на лиганды толл-подобных рецепторов (TLR) [2]. Во время естественного антимикробного или противовирусного иммунного ответа связывание патогенассоциированных молекулярных паттернов с TLR инициирует активацию антигенраспознающих клеток. Это необходимо для адекватной презентации антигена, миграции дендритных клеток в лимфатический узел и в конечном счете для эффективного праймирования Т-клеток. Оптимальный адъювант противоопухолевой вакцины должен обладать свойствами, характерными для патогенассоциированных молекулярных паттернов. В дополнение к способности индуцировать Т-клеточный ответ адъювант должен быть безопасен и доступен [3].

Poly(I:C) — полиинозиновая-полицитидиловая кислота, синтетический аналог двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (РНК), обладает как выраженным противовирусным, так и противоопухолевым потенциалом [4]. Poly(I:C) и ее модификации уже несколько десятилетий изучаются в качестве адъю-

вантов для иммунотерапии рака [5–8]. Двухцепочечная РНК появляется в клетках при вирусном заражении, представляя собой либо геном вирусов, либо промежуточный продукт репродукции вирусов, и индуцирует выработку интерферона (ИФН) 1-го типа и ряда других цитокинов [9].

В моделях на мышах после введения Poly(I:C) наблюдается замедление роста сингенных опухолевых имплантатов, что связано с активностью натуральных киллеров, дендритных клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов [10, 11]. Однако клинические исследования Poly(I:C) в качестве самостоятельного агента для лечения рака не показали ее положительного влияния на клинический исход, вероятно из-за короткого периода полураспада [12]. Стабилизированная форма Poly-ICLC оказалась в 5–10 раз более устойчивой к гидролизу в сыворотке приматов и индуцировала значительное увеличение уровня ИФН в сыворотке крови [13]. Повышенная стабильность привела к повышению токсичности. Тем не менее оказалось, что токсические эффекты Poly-ICLC можно уменьшить путем снижения дозы и изменения пути введения [14, 15]. Недавно были опубликованы результаты клинических испытаний пептидных вакцин, содержащих в качестве адъюванта Poly-ICLC (Хилтонол), для противоопухолевой терапии [16, 17].

В Институте медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработан препарат Ридостин Про, представляющий собой комплекс

натриевых солей двуспиральных и односпиральных РНК из киллерного штамма пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Ридостин Про является улучшенным аналогом препарата ридостин, разрешенного в Российской Федерации для применения в качестве противовирусного и иммуномодулирующего средства. Преимуществом Ридостина Про по сравнению с синтетическими аналогами двухцепочечной РНК является то, что природная двухцепочечная РНК при сопоставимой противовирусной и иммуномодулирующей активности не обладает способностью к кумуляции и гепатотоксичностью [18].

Ранее нами была создана модель персонализированной пептидной неоантигенной вакцины против меланомы мышей B16-F10 [19]. В качестве адъюванта при исследовании модели пептидной вакцины у мышей мы использовали Poly(I:C) [20–22]. Однако для дальнейшей разработки персонализированных пептидных неоантигенных вакцин необходим адъювант, показавший безопасность и эффективность в клинических испытаниях.

Цель исследования — оценить способность адъювантов Ридостин Про и Poly(I:C) вызывать специфический Т-клеточный ответ на неоантигенные синтетические пептиды; определить противоопухолевую эффективность неоантигенной пептидной вакцины с адъювантами Ридостин Про или Poly(I:C).

Материалы и методы

Ридостин Про — рибонуклеинат натрия, индуктор интерферона пролонгированного действия, иммуномодулятор — предоставлен Институтом медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Состав препарата Ридостин Про: комплекс натриевых солей двуспиральных и одноцепочечных РНК из киллерного штамма пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с содержанием нуклеотидного материала от 70 до 90 %, двуспиральной РНК от 10 до 22 % (действующее начало); субстанция для изготовления лекарственных форм (ФСП № 002021/01 — 070420090769-08); поливинилпирролидон (стабилизатор, обеспечивающий пролонгацию биологических эффектов РНК). Лекарственная форма: лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения.

Poly(I:C) (polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt, P1530-100MG, Sigma) — синтетический аналог двухцепочечной РНК.

Способность Ридостина Про и Poly(I:C) вызывать специфический Т-клеточный ответ оценивали с помощью метода ELISpot. Для этого мышам-самкам линии C57Bl/6J весом 20–22 г без опухолей подкожно вводили модели вакцины, содержащие адъюванты с синтетическими неоантигенными пептидами. Для моделей вакцины сформировали 2 группы пептидов (табл. 1).

Таблица 1. Две группы пептидов, использовавшихся для оценки способности адъювантов вызывать специфический Т-клеточный ответ
Table 1. Two groups of peptides used to evaluate the ability of adjuvants to elicit a specific T-cell response

Название пептида Peptide name	Ген Gene	Замена Replacement	Последовательность Sequence
Пептиды 1 Peptides 1			
g.101573665	<i>Krt75</i>	p.G56A	GRISGIGS_A_FGSRSLYNLGGTRRVSIG
g.108075690C>A	<i>Ampd2</i>	p.Q666H	LSENISHGLLLRKAPVL_H_YLYYLAQIG
g.108814677G>C	<i>Nckipsd</i>	p.K492N	MQTDTQDHQ_N_LCYSAVLAMVFSMGEA
g.110327865C>T	<i>Pole</i>	p.L1847F	TLHNMMKK_F_FLQLIAEFKRLGSSVVYA
g.142664440A>G	<i>Wipi2</i>	p.T304A	PSQVTEMFNQGRAFA_A_VRLPFCGHKNI
Пептиды 2 Peptides 2			
g.56226589G>T	<i>Herc2</i>	p.C4450F	GGLAGPDGTSVFGQM_F_AKMSSFSPDS
g.65813948T>A	<i>Pbk</i>	p.V145D	GSPFPAAVILR_D_ALHMARGLKYLHQEK
g.66708664A>C	<i>Lins1</i>	p.K154T	MRMLQNSD_T_LLSHMAAKCLASLLYFQL
g.7163330C>T	<i>Pcmt1</i>	p.P222L	LAVSFAPLVQ_L_SKNDNGTPDSVGLPPC
g.77174891A>C	<i>2210408121Rik</i>	p.D13A	DALQEYSHNSF_A_LQCLLSNFPDLEFK

Таблица 2. Пептид для оценки противоопухолевого эффекта моделей вакцины с адъювантами Ридостин Про или Poly(I:C)

Table 2. Peptide for evaluating the antitumor effect of vaccine models with adjuvants Ridostin Pro or Poly(I:C)

Название пептида Peptide name	Ген Gene	Замена Replacement	Последовательность Sequence
PSKPSFQE	<i>Kif18b</i>	p.K739N	PSKPSFQEFVDWE_N_VSPELNSTDQPFL

Для проведения исследования животных разделили на группы:

- пептиды 1 + Poly(I:C) (4 мыши);
- пептиды 2 + Poly(I:C) (4 мыши);
- пептиды 1 + Ридостин Про (4 мыши);
- пептиды 2 + Ридостин Про (4 мыши).

Одна доза модели вакцины из 5 пептидов (пептиды 1 или пептиды 2) содержала по 100 мкг каждого пептида (всего 500 мкг пептидов) в 500 мкл 10 % раствора диметилсульфоксида в физиологическом растворе. Смесь пептидов вводили подкожно. Адъюванты растворяли в физиологическом растворе. Одна доза Poly(I:C) содержала 50 мкг данного адъюванта в 300 мкл физиологического раствора, а 1 доза Ридостина Про содержала 100 мкг этого адъюванта в 300 мкл физиологического раствора. Адъюванты вводили подкожно за 5–10 мин до введения смеси пептидов.

Иммунизацию мышей проводили двукратно с недельными интервалами, в 0-й и 7-й дни. На 12-й день у мышей забирали селезенки для определения количества ИФН- γ -продуцирующих клеток методом ELISpot с помощью набора для определения мышечного ИФН- γ (3321-2AW-Plus, Mabtech). Спленоциты 48 ч инкубировали со смесями пептидов 1 или пептидов 2 (100 мкг/мл), Ридостином Про (300 мкг/мл) или Poly(I:C) (250 мкг/мл), в качестве положительного контроля использовали конканавалин А.

Противоопухолевую эффективность Ридостина Про и Poly(I:C) оценивали по торможению роста меланомы мышей B16-F10 и увеличению продолжительности жизни мышей. В данном эксперименте модели вакцины содержали только 1 пептид (табл. 2).

Для исследования мышей-самок линии C57Bl/6J весом 20–22 г разделили на группы:

- контроль (8 мышей);
- Ридостин Про (6 мышей);
- Poly(I:C) (6 мышей);
- пептид PSKPSFQE + Ридостин Про (5 мышей);
- пептид PSKPSFQE + Poly(I:C) (5 мышей).

Одна доза вакцины содержала 100 мкг пептида в 300 мкл 3 % раствора диметилсульфоксида в физиологическом растворе. Пептид вводили подкожно. Одна доза Poly(I:C) содержала 50 мкг адъюванта в 300 мкл физиологического раствора, а 1 доза Ридостина Про — 100 мкг адъюванта в 300 мкл физиологического раствора. Адъюванты также вводили подкожно, в группах с пептидом — за 5–10 мин до пептида.

Мышей иммунизировали четырехкратно на 0, 7, 14 и 21-й дни эксперимента. На 10-й день от начала введения препаратов мышам перевивали подкожно опухоль B16-F10 по 75 тыс. клеток на мыш. Далее измеряли рост меланомы B16-F10 от дня перевивки опухоли (0-й день), чтобы оценить торможение роста опухоли.

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

$$\text{ТРО (\%)} = (V_k - V_o) / V_k \times 100,$$

где V_k — средний объем опухолей в контрольной группе (мм^3), V_o — средний объем опухолей в опытной группе (мм^3).

Также оценивали изменение продолжительности жизни мышей в группах, получавших препараты, по сравнению с контролем. Увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) вычисляли после гибели всех животных в опыте по формуле:

$$\text{УПЖ (\%)} = (\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k) / \text{СПЖ}_k \times 100,$$

где СПЖ $_k$ — средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни), СПЖ $_o$ — средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

Результаты и обсуждение

Оценивали влияние на продукцию ИФН- γ Ридостина Про и Poly(I:C) в качестве адъювантов в составе 2 моделей вакцины, каждая из которых отличалась по пептидному составу (см. табл. 1). Оказалось, что Ридостин Про эффективнее, чем Poly(I:C), повышал иммуногенность пептидов и в модели вакцины с пептидами 1, и в модели с пептидами 2 (рис. 1). Также показана специфичность действия пептидов, входящих в состав обеих моделей вакцины с обоими адъювантами: в спленоцитах мышей, которых иммунизировали вакциной с пептидами 1, добавление *in vitro* пептидов 2 не вызывало усиления продукции ИФН- γ , а в спленоцитах мышей, которых иммунизировали вакциной с пептидами 2, добавление в лунки планшета с клетками пептидов 1 также не вызывало увеличения количества ИФН- γ -продуцирующих клеток. Интересно, что модель с пептидами 1 при использовании адъюванта Poly(I:C) оказалась слабоиммуногенна,

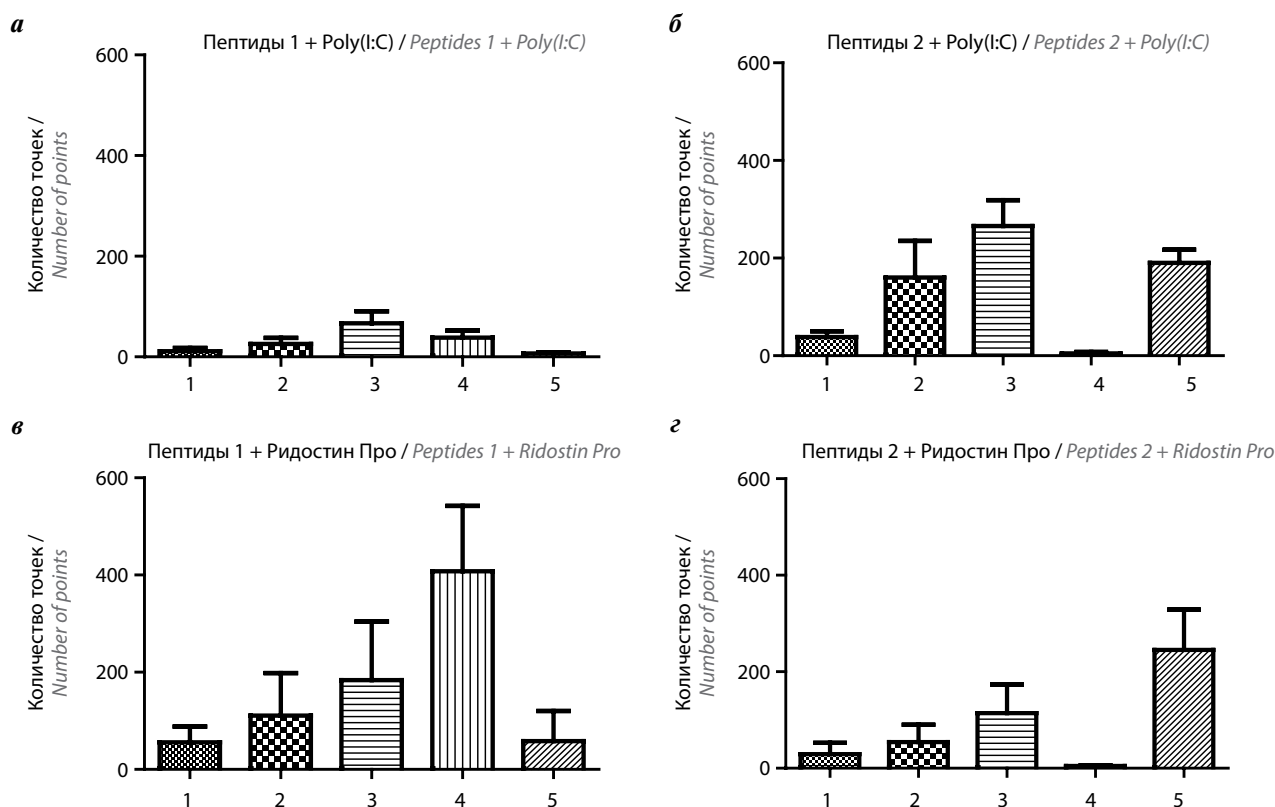


Рис. 1. Изменение количества интерферон- γ -продуцирующих клеток при стимуляции *in vitro* спленоцитов мышей, получавших разные модели вакцины: пептиды 1 с адъювантом Poly(I:C) (а); пептиды 2 с адъювантом Poly(I:C) (б); пептиды 1 с адъювантом Ридостин Про (в); пептиды 2 с адъювантом Ридостин Про (г). *In vitro* стимуляция: 1 – контроль; 2 – Ридостин Про; 3 – Poly(I:C); 4 – пептиды 1; 5 – пептиды 2

Fig. 1. Changes in the number of interferon- γ -producing cells during *in vitro* stimulation of splenocytes of mice treated with different vaccine models: peptides 1 with adjuvant Poly(I:C) (a), peptides 2 with adjuvant Poly(I:C) (б), peptides 1 with adjuvant Ridostin Pro (в), peptides 2 with adjuvant Ridostin Pro (г). Stimulation *in vitro*: 1 – control; 2 – Ridostin Pro; 3 – Poly(I:C); 4 – peptides 1; 5 – peptides 2

тогда как при использовании в качестве адъюванта Ридостина Про наблюдалось увеличение количества ИФН- γ -продуцирующих клеток.

Исследование противоопухолевой эффективности моделей вакцины, содержащих пептид PSKPSFQE, показало, что и Ридостин Про, и Poly(I:C) в составе

вакцины, а также при одиночном применении вызывали торможение роста меланомы B16-F10 у мышей (рис. 2, табл. 3).

Ридостин Про при введении без пептида увеличивал процент выживаемости мышей с меланомой B16-F10 несколько эффективнее, чем Poly(I:C) (рис. 3, а).

Таблица 3. Противоопухолевая эффективность адъювантов и моделей вакцины с адъювантами

Table 3. Antitumor efficacy of adjuvants and vaccine models with adjuvants

Воздействие Impact	Торможение роста опухоли, % Inhibition of tumor growth, %					Увеличение продолжительности жизни, % Increase in life expectancy, %
	15-е сутки 15 th day	18-е сутки 18 th day	23-и сутки 23 rd day	28-е сутки 28 th day	31-е сутки 31 st day	
Ридостин Про Ridostin Pro	88	88	95	93	90	23
Poly(I:C)	100	82	88	86	78	1
Ридостин Про + PSKPSFQE Ridostin Pro + PSKPSFQE	82	93	94	95	95	25
Poly(I:C) + PSKPSFQE	89	91	93	89	90	31

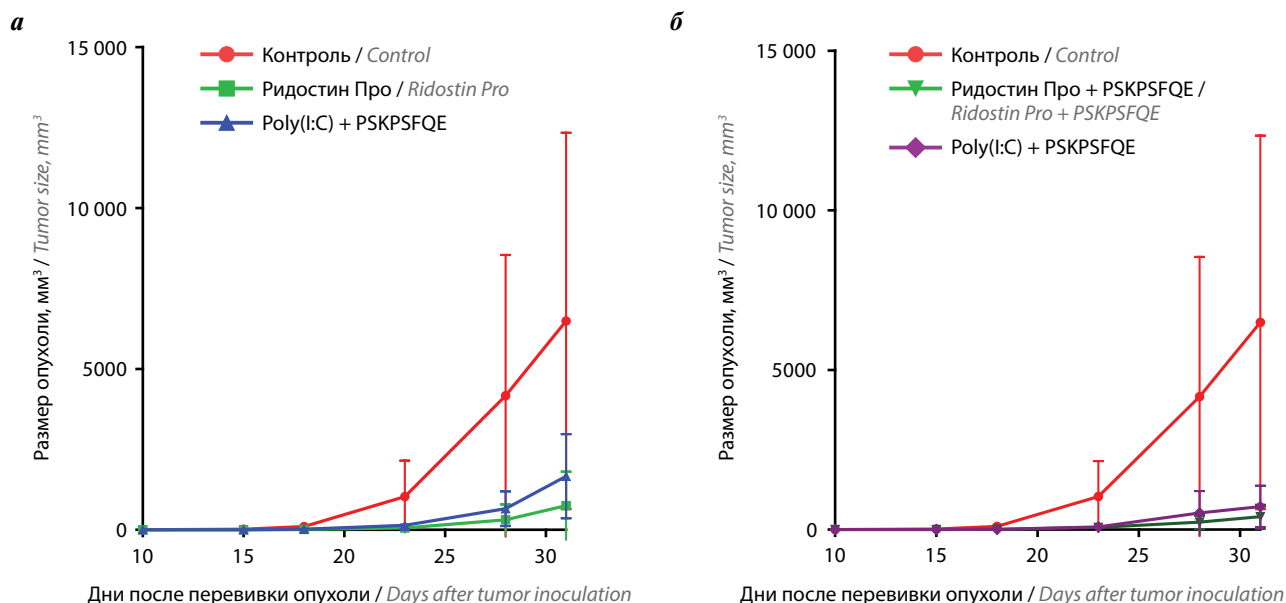


Рис. 2. Влияние адъювантов (а) и моделей вакцины с адъювантами (б) на рост меланомы B16-F10

Fig. 2. The effect of adjuvants (a) and vaccine models with adjuvants (b) on the growth of melanoma B16-F10

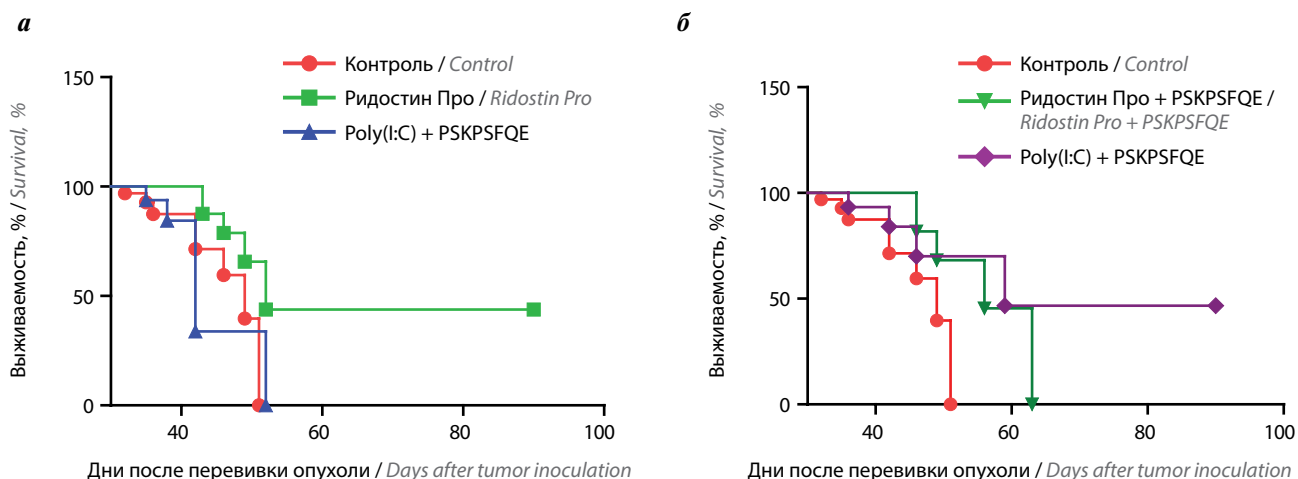


Рис. 3. Влияние адъювантов (а) и моделей вакцины с адъювантами (б) на выживаемость мышей с B16-F10

Fig. 3. The effect of adjuvants (a) and vaccine models with adjuvants (b) on the survival of mice with B16-F10

Одна из 6 мышей в группе, получавшей Ридостин Про, прожила более 90 дней. Однако в группе, получавшей вакцину с Ридостином Про, все мыши в итоге погибли, а в группе, получавшей вакцину с Poly(I:C), наблюдали излечение 1 из 5 мышей, она прожила более 90 дней (рис. 3, б).

Из литературы известно о способности Poly(I:C) усиливать специфический иммунный ответ на пептиды, входящие в состав вакцин [6]. Например, в исследовании Н. Sultan и соавт. [23] при сравнении адъювантных свойств Poly(I:C) с некоторыми ее аналогами Poly(I:C) продемонстрировала наилучшие результаты. В нашей работе мы показали, что Ридостин Про тоже способен

к антигенспецифическому праймированию Т-клеток, причем даже немного лучше, чем Poly(I:C).

В работе С. Castle и соавт. [24] описан противоопухолевый эффект пептидной вакцины, содержащей такой же, как в нашем исследовании, пептид PSKPSFQE и адъювант Poly(I:C), на модели мышинной меланомы B16-F10. Вакцина вызвала более сильное замедление роста опухоли, чем введение только Poly(I:C). Мы в нашей работе наблюдали схожий эффект, хотя у нас были небольшие отличия в постановке эксперимента по сравнению с указанной публикацией.

Насколько нам известно, способность Ридостина Про усиливать иммуногенность пептидов, а также

замедлять рост меланомы при применении в составе неоантигенной вакцины показана нами впервые. Некоторые отличия в эффективности Poly(I:C) и Ридостина Про можно объяснить небольшой выборкой животных или тем, что Ридостин Про содержит кроме двухцепочечной также и односпиральную РНК, что допускает вовлечение в иммунный ответ TLR-7 и TLR-8 (помимо TLR-3) и может объяснить его повышенную иммуностимулирующую активность [25, 26]. В связи с этим заслуживают дальнейшего более детального изучения иммунологические процессы, вызываемые введением в состав пептидной неоантигенной противоопухолевой вакцины Ридостина Про в качестве адъюванта.

Заключение

Включение Ридостина Про в качестве адъюванта в состав нескольких моделей пептидной неоантигенной вакцины с разными пептидами показало, что он более эффективно усиливает иммуногенность пептидов, чем препарат сравнения Poly(I:C). Вакцина с адъювантом Ридостин Про, так же как и с Poly(I:C), замедляла рост меланомы B16-F10 и увеличивала среднюю продолжительность жизни мышей с опухольями.

Хотя это только начало исследований Ридостина Про, полученные результаты показывают высокий потенциал данного препарата в качестве адъюванта для пептидных неоантигенных вакцин.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Барышникова М.А., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. Неоантигены в иммунотерапии опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(2):6–14. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-6-14.
2. Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Neoantigens in tumor immunotherapy. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(2):6–14. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-6-14
3. Gouttefangeas C., Rammensee H.-G. Personalized cancer vaccines: adjuvants are important, too. Cancer Immunol Immunother 2018;67(12):1911–8. DOI: 10.1007/s00262-018-2158-4
4. Барышникова М.А., Косоруков В.С. Адъюванты в вакцино-терапии опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(4):36–44. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-36-44.
5. Baryshnikova M.A., Kosorukov V.S. Cancer vaccine adjuvants. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(4):36–44. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-36-44
6. Matsumoto M., Seya T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). Adv Drug Deliv Rev 2008;60(7):805–12. DOI: 10.1016/j.addr.2007.11.005
7. Levine A.S., Levy H.B. Phase I–II trials of poly IC stabilized with poly-L-lysine. Cancer Treat Rep 1978;62(11):1907–12.
8. Ammi R., De Waele J., Willemen Y. et al. Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs. Pharmacol Ther 2015;146:120–31. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.09.010
9. Jasani B., Navabi H., Adams M. Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. Vaccine 2009;27(25–26):3401–4. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.071
10. Sultan H., Salazar A.M., Celis E. Poly-ICLC, a multi-functional immune modulator for treating cancer. Semin Immunol 2020;49:101414. DOI: 10.1016/j.smim.2020.101414
11. Gürtler C., Bowie A.G. Innate immune detection of microbial nucleic acids. Trends Microbiol 2013;21(8):413–20. DOI: 10.1016/j.tim.2013.04.004
12. Akazawa T., Ebihara T., Okuno M. Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104(1):252–7. DOI: 10.1073/pnas.0605978104
13. Azuma M., Ebihara T., Oshiumi H. Cross-priming for antitumor CTL induced by soluble Ag + polyI:C depends on the TICAM-1 pathway in mouse CD11c(+)/CD8α(+) dendritic cells. Oncoimmunology 2012;1(5):581–92. DOI: 10.4161/onci.19893
14. Robinson R.A., DeVita V.T., Levy H.B. et al. A phase I–II trial of multiple-dose polyribonucleic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. J Natl Cancer Inst 1976;57(3):599–602. DOI: 10.1093/jnci/57.3.599
15. Levy H.B., Baer G., Baron S. et al. A modified polyribonucleic-polyribocytidylic acid complex that induces interferon in primates. J Infect Dis 1975;132(4):434–9. DOI: 10.1093/infdis/132.4.434
16. Maluish A.E., Reid J.W., Crisp E.A. et al. Immunomodulatory effects of poly(I,C)-LC in cancer patients. J Biol Response Mod 1985;4(6):656–63.
17. Salazar A.M., Levy H.B., Ondra S. et al. Long-term treatment of malignant gliomas with intramuscularly administered polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with polylysine and carboxymethylcellulose: an open pilot study. Neurosurgery 1996;38(6):1096–103; discussion 1103–4.
18. Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. Nature 2017;547(7662):217–21. DOI: 10.1038/nature22991
19. Ott P.A., Hu-Lieskovan S., Chmielowski B. et al. A phase Ib trial of personalized neoantigen therapy plus anti-PD-1 in patients with advanced melanoma, non-small cell lung cancer, or bladder cancer. Cell 2020;183(2):347–362.e24. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.053
20. Масычева В.И., Сазонов В.С., Морозова Е.Н. и др. Токсические свойства двуспиральной РНК вирусоподобных частиц киллерных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Антибиотики и медицинская биотехнология 1986;5:374–8.
21. Masysheva V.I., Sazonov V.S., Morozova E.N. et al. Toxic properties of double-chiral RNA of virus-like particles of killer yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Antibiotiki i meditsinskaya biotekhnologiya = Antibiotics and medical biotechnology 1986;5:374–8.
22. Косоруков В.С., Барышникова М.А., Кособокова Е.Н. и др. Выявление иммунных мутантных неоантигенов в геноме меланомы мыши. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(3):23–30. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-23-30
23. Kosorukov V.S., Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N. et al. Identification of immunogenic mutant neoantigens in the genome of murine melanoma. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(3):23–30. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-23-30
24. Барышникова М.А., Рудакова А.А., Соколова З.А. и др. Оценка противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для модели противомеланомной вакцины. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(4):76–81. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-76-81

- Baryshnikova M.A., Rudakova A.A., Sokolova Z.A. et al. Evaluation of the antitumor efficacy of synthetic neoantigen peptides for the melanoma vaccine model. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(4): 76–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-76-81
21. Рудакова А.А., Барышникова М.А., Соколова З.А. и др. Оценка иммуногенности синтетических неоантигенных пептидов для модели противомеланомной вакцины. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(2):61–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-61-68
Rudakova A.A., Baryshnikova M.A., Sokolova Z.A. et al. Evaluation of immunogenicity of synthetic neoantigen peptides for the melanoma vaccine model. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(2):61–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-61-68
 22. Пономарев А.В., Рудакова А.А., Соколова З.А. и др. Влияние Poly(I:C) и меланомы B16-F10 на иммунофенотип клеток селезенки мышей. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(4):51–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-51-58
Ponomarev A.V., Rudakova A.A., Sokolova Z.A. et al. Effect of Poly(I:C) and melanoma B16-F10 on the immunophenotype of murine spleen cells. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4):51–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-51-58
 23. Sultan H., Fesenkova V.I., Addis D. et al. Designing therapeutic cancer vaccines by mimicking viral infections. *Cancer Immunol Immunother* 2017;66(2):203–13. DOI: 10.1007/s00262-016-1834-5
 24. Castle J.C., Kreiter S., Diekmann J. et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res* 2012;75(5):1081–90. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3722
 25. Heil F., Hemmi H., Hochrein H. et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303(5663):1526–9. DOI: 10.1126/science.1093620
 26. Vasilakos J.P., Tomai M.A. The use of Toll-like receptor 7/8 agonists as vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2013;12(7):809–19. DOI: 10.1586/14760584.2013.811208

Вклад авторов

М.А. Барышникова, А.В. Пономарев: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование рукописи;
А.А. Рудакова, З.А. Соколова: предоставление материалов исследования, сбор и обработка данных, редактирование рукописи;
Н.В. Голубцова, П.В. Царапаев: сбор и обработка данных, редактирование рукописи;
Г.М. Левагина, Е.Д. Даниленко: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи;
В.С. Косоруков: разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных.

Author's contributions

M.A. Baryshnikova, A.V. Ponomarev: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article written, editing of the article;
A.A. Rudakova, Z.A. Sokolova: provision of study materials, data collection and processing, editing of the article;
N.V. Golubtsova, P.V. Tsarapaev: data collection and processing, editing of the article;
G.M. Levagina, E.D. Danilenko: provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article;
V.S. Kosorukov: concept and design, data analysis and interpretation.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.А. Барышникова / M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>
А.В. Пономарев / A.V. Ponomarev: <https://orcid.org/0000-0001-9517-8183>
А.А. Рудакова / A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>
З.А. Соколова / Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>
Н.В. Голубцова / N.V. Golubtsova: <https://orcid.org/0000-0002-8630-1968>
П.В. Царапаев / P.V. Tsarapaev: <https://orcid.org/0000-0002-1182-1010>
Г.М. Левагина / G.M. Levagina: <https://orcid.org/0000-0002-0394-9698>
Е.Д. Даниленко / E.D. Danilenko: <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>
В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

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.

Statement of the welfare of animals. 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.

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках исследования № AAA-A-20-120022090056-5.

Funding. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the research No. AAA-A-20-120022090056-5.

Статья поступила: 01.09.2022. **Принята к публикации:** 29.09.2022.

Article received: 01.09.2022. **Accepted for publication:** 29.09.2022.

При направлении статьи в редакцию журнала «Российский биотерапевтический журнал» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами, составленными с учетом «Единых требований к рукописям, предоставляемым в биомедицинские журналы» (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals), разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors).

Редакция просит авторов в подготовке рукописей руководствоваться изложенными ниже правилами. Рукописи, оформленные без соблюдения данных правил, редакцией рассматриваться не будут.

1. Общие правила

Статья в обязательном порядке должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором выполнена данная работа, с подписью руководителя, заверенной печатью учреждения. При первичном направлении рукописи в редакцию в копии электронного письма должны быть указаны все авторы данной статьи. Обратная связь с редакцией будет поддерживать ответственный автор, обозначенный в статье (см. пункт 2).

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

Присланные статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат» и принимаются в случае удовлетворительного результата (определяемого для каждой из статей в индивидуальном порядке по соотношению оригинальных фрагментов текста, заимствованных фрагментов и наличия оформленных ссылок).

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- 1) название статьи прописными буквами (шрифт **жирный**);
- 2) инициалы и фамилии всех авторов (шрифт **обычный**);
- 3) место работы каждого из авторов, адрес учреждения с указанием индекса (шрифт *курсив*);
- 4) ORCID авторов;
- 5) адрес электронной почты ответственного за связь автора (шрифт *курсив*).

Данные, указанные в пунктах 1–3, должны быть предоставлены на русском и английском языках.

Пример:

ПУБЛИКАЦИЯ СТАТЬИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

И.И. Иванов¹, П.П. Петров²

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11

Контакты: Иван Иванович Иванов chem_analysis@ronc.ru

THE PUBLICATION OF THE ARTICLE IN «ROSSIYSKY BIOTHERAPEVTICHESKY JZHURNAL»

I.I. Ivanov¹, P.P. Petrov²

¹N.N. Blokhin NMRCO; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115522, Russia;

²FSBSI "G.F. Gause Research Institute of search for new antibiotics"; 11 Bolshaya Pirogovskaya St, Moscow, 119435, Russia

Последняя страница должна содержать:

- 1) Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - фамилия, имя, отчество полностью;
 - занимаемая должность;
 - ученая степень, ученое звание;
 - контактный телефон;
 - рабочий адрес с указанием индекса;
 - адрес электронной почты.

2) Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в формате doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, размер 12, междустрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы.

Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (включая список литературы, таблицы и подписи к рисункам)

Обзор литературы – не более 15 страниц,

оригинальная статья – не более 12 страниц,

краткие сообщения – не более 4 страниц.

Большой объем статьи допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции.

5. Резюме и ключевые слова

Ко всем видам статей на второй странице должно быть приложено резюме на русском и английском языках. Слова «резюме» и «abstract» не указываются. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики. Для оригинальных статей резюме обязательно должно содержать следующие разделы:

- введение;
- материалы и методы;
- заключение (выводы).
- цель;
- результаты;

Объем резюме – 200–250 слов. Резюме не должно содержать ссылки на литературные источники и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются **ключевые слова** на русском и английском языке в количестве 3–10.

6. Структура статей

Оригинальная статья и краткое сообщение экспериментального или клинического характера должны содержать следующие разделы:

- введение;
- материалы и методы;
- заключение (выводы);
- при наличии финансирования исследования указать его источник (грант и т. д.);
- благодарности (раздел не является обязательным).
- цель;
- результаты и обсуждение;
- конфликт интересов;

Обзоры литературы, статьи теоретического и концептуального характера должны включать следующие разделы:

- введение;
- разделы по отдельным обсуждаемым вопросам;
- заключение (выводы).

Введение. Краткий обзор состояния вопроса со ссылками на наиболее значимые публикации, причина необходимости проведения исследования.

Цель. 1–3 предложения о том, какую проблему или гипотезу решает автор и с какой целью.

Материалы и методы. Подробное изложение методик исследования, аппаратуры, критериев отбора участников, их число и характеристики, способы и принципы распределения на группы, дизайн исследования, методы статистического анализа. Описанные методы исследования должны гарантировать возможность воспроизведения результатов. При перечислении использованной аппаратуры и препаратов в скобках указываются производитель и страна; при перечислении используемых в ходе работы лекарственных препаратов и химических веществ – их международное непатентованное (общепринятое) название, дозы, пути введения.

В конце статьи о проведенном исследовании указать, решением какого этического комитета оно одобрено, номер и дату протокола исследования, а также факт подписания испытуемыми информированного согласия.

Результаты. Должны быть представлены в логической последовательности, отражать данные описанного выше исследования с указаниями на графики, таблицы и рисунки. Допускается сопоставление полученных результатов с данными других исследователей. Возможно включение обоснованных рекомендаций для клинической практики и применения полученных данных в предстоящих исследованиях. Следует избегать повторения сведений из раздела «Введение». Результаты представляются четко, в виде коротких описаний.

Заключение. Должно быть кратким и лаконичным. Подведение итога проделанной работы и гипотеза авторов о значении полученных данных – в рамках патогенеза, лечения, диагностики; перспективы использования полученных данных.

7. Иллюстративный материал

Иллюстративным материалом являются фотографии, рисунки, схемы, графики, диаграммы, таблицы. В тексте должны быть указаны ссылки на таблицы и рисунки, например: (табл. 1), (рис. 1) или **на рис. 1 представлены**. . . , которые должны быть размещены в соответствующих по смыслу абзацах и последовательно пронумерованы. Рисунки и таблицы нумеруются отдельно.

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Схемы, графики, диаграммы, таблицы могут быть собраны в общие файлы по типу иллюстративного материала с началом каждого с новой страницы. Например: все таблицы собраны в отдельный от статьи файл, где каждая новая таблица начинается с новой страницы. Если в этой же статье есть диаграммы, то они будут составлять следующий файл, где будут собраны исключительно диаграммы, и каждая из них будет размещена на отдельном листе документа. Файлы иллюстративного материала должны позволять воспроизвести высокое качество изображения в электронной и печатной версии журнала. Если иллюстративный материал ранее был опубликован в других изданиях, автор обязан предоставить в редакцию разрешение правообладателя на публикацию данного изображения в другом журнале, в противном случае это будет считаться плагиатом и к публикации принято не будет. Количество иллюстраций должно соответствовать объему предоставляемой информации, избыточность иллюстраций может привести к возвращению авторам статьи для доработки на предмет сокращения. Данные таблицы не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в формате TIFF, JPG с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм). Глаза пациентов или здоровых испытуемых на фотографиях должны быть закрыты черным прямоугольником, в случае его отсутствия автор должен предоставить в редакцию письменное разрешение пациента на публикацию.

Рисунки, графики, схемы, диаграммы представляются в формате EPS Adobe Illustrator 7.0–10.0 или Office Excel. При невозможности представления в данном формате необходимо связаться с редакцией.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подрисовочными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисовочной подписи. Подписи к рисункам даются на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

Названия рисунков должны быть переведены на английский язык.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Необходимо указывать применявшийся для анализа статистический метод и соответствующее значение достоверности (р). В случае размера таблиц больше, чем на лист А4, они представляются в виде отдельного файла doc, docx, rtf.

Названия таблиц должны быть переведены на английский язык.

Все **формулы** должны быть тщательно выверены автором, набраны или встроены в формат текстового редактора. В формулах необходимо различать строчные и прописные, латинские и греческие, подстрочные и надстрочные буквы. Используемые автором сокращения должны быть разъяснены под формулой.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ). Если исследование проводилось на приборах, дающих показатели в других единицах, необходимо перевести их в систему СИ с указанием коэффициента пересчета или компьютерной программы в разделе «Материалы и методы».

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, рак предстательной железы (РПЖ)). Список использованных сокращений приводится после списка литературы. Не следует параллельно использовать термин и его сокращение.

Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

9. Список литературы

Не менее 50 процентов источников из списка литературы должны быть опубликованы за последние 5 лет, в том числе в журналах, индексируемых в базах данных *Web of Science*, *Scopus*, *Science Index*.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по мере цитирования в тексте статьи, но не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например: [5], [7, 8], [7–9]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательно не более 25 источников, в обзорах литературы — не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они упомянуты. Ссылки на неопубликованные работы, учебники, учебные пособия, нормативные и архивные материалы, статистические сборники, ГОСты, распоряжения, анонимные источники, публикации в СМИ, монографии, авторефераты и диссертации и т. д. не допускаются.

В цитируемой литературе нужно указывать источники с DOI (Digital Object Identifier, подробнее на сайте www.crossref.org) при наличии и PMID (PubMed identifier, подробнее на сайте <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ссылки на источники литературы должны быть оформлены следующим образом: для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

Для каждого русскоязычного источника должен приводиться перевод на английский язык (можно проверить на сайте elibrary.ru). При отсутствии перевода основных сведений в первоисточнике необходима транслитерация ссылки на английский язык (рекомендуем обращаться на сайт translit.net (стандарт транслитерации – BSII)).

Статья в журнале

Фамилия И.О. авторов. Название статьи. Название журнала год: том (номер выпуска): страницы (повторяющиеся цифры страниц не указывать, например: 185–7).

Примеры:

Srighley J.R., Delahunt B., Eble J.N. et al. The International society of urological pathology (ISUP) Vancouver classification of renal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2013;37 (10):1469–89. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318299f4d1.

Михайленко Д.С., Алексеев Б.Я., Ефремов Г.Д., Каприн А.Д. Генетические особенности несветлоклеточного рака почки. *Онкоурология* 2016;12(3):14–21. DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-3-14-21. [Mikhaylenko D.S., Alekseev B.Y., Efremov G.D., Kaprin A.D. Genetic characteristics of the non-clear cell renal cancer. *Cancer Urology* 2016;12 (3):14–21. (In Russ.)].

Монографии, сборники тезисов

Фамилия И.О. авторов. Полное название книги. Место издания: название издательства; год издания; номера страниц или общее количество страниц.

Примеры:

Матвеев Б.П., Бухаркин Б.В., Калинин С.А. Лечение гормонорезистентного рака предстательной железы. В кн.: Материалы конференции «Онкологическая урология: от научных исследований к клинической практике (современные возможности лечения опухолей предстательной железы, мочевого пузыря и почки)». М., 2004. С. 28–31. [Matveev B.P., Buharkin B.V., Kalinin S.A. Treatment of the hormone resistant prostate cancer. In the book: Materials of the conference «Oncologic urology: from scientific studies to clinical practice (modern opportunities for the treatment of prostate, bladder and kidney tumors). Moscow, 2004. P. 28–31. (In Russ.)].

Каприн А.Д., Нестеров П.В., Костин А.А. и др. Особенности хирургического этапа лечения пациентов, страдающих раком мочевого пузыря с синдромом нижних мочевых путей. Материалы I конгресса Рос. общества онкоурологов: тез. докл. М., 2006. С. 87–88. [Kaprin A.D., Nesterov P.V., Kostin A.A. et al. Peculiarities of the surgical stage of the treatment of patients with bladder cancer with the syndrome of lower urinary tracts. Materials of the I congress of the Russian Oncourologists Society: report abstract. Moscow, 2006. P. 87–88. (In Russ.)].

Патенты

Фамилия И.О. изобретателя, заявителя, патентовладельца. Название изобретения. Обозначение вида документа, название страны, номер, дата публикации (регистрационный номер заявки, дата подачи).

Пример:

Колс Ян. Применение Мидостаурина для лечения желудочно-кишечных стромальных опухолей. Патент США № 5093330 от 03.03.1992 г. [Kols Jan (BE) Administration of Midostaurin for treating gastrointestinal stromal tumours. RU2 410 098 C2. (In Russ.)].

При ссылке на **данные, полученные из Интернета**, указывают электронный адрес цитируемого источника.

10. Этические вопросы

• Авторство

Право называться автором имеют лица, которые:

- 1) внесли значительный вклад в концепцию и дизайн исследования или в анализ и интерпретацию данных;
- 2) активно участвовали в подготовке текста статьи или внесении принципиальных изменений;
- 3) участвовали в окончательном утверждении версии, которая сдается в печать;
- 4) готовы принять на себя ответственность за содержание статьи.

Исключительно обеспечение финансирования или подбор материала для статьи не оправдывает включения в состав авторской группы. Общее руководство исследовательским коллективом также не признается достаточным для авторства.

Редакторы вправе запросить информацию о вкладе каждого из авторов в написание статьи и опубликовать ее.

Возможные варианты участия авторов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных (включая статистический), обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи и др.

Пример:

А.М. Иванов: разработка дизайна исследования;

В.С. Петров, Г.П. Сидоров: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

М.М. Иванова: написание текста рукописи;

О.Д. Сидорова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных.

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, не оказавшие помощь в проведении исследования по сбору, анализу и интерпретации данных, предоставлению материалов и инструментов, должны быть перечислены с их согласия в разделе «Благодарности».

• Конфликт интересов

В конце статьи необходимо указать наличие конфликта интересов для всех авторов. Конфликт интересов подразумевает наличие каких-либо связей и/или личной заинтересованности, которые потенциально могут повлиять на результаты, интерпретацию полученных данных, объективное их восприятие, в частности финансовые отношения и сотрудничество с какими-либо организациями (например, получение гонораров, образовательных грантов, участие в экспертных советах, членство, трудовые отношения, консультационная работа, владение магазином в частной собственности или другие интересы) или нефинансовая заинтересованность (например, личные или профессиональные взаимоотношения, знакомства и пр.), касающиеся рассматриваемых в статье вопросов и/или материалов.

В случае отсутствия конфликта интересов в конце статьи следует констатировать следующее:

Для статьи 1 автора/2 и более авторов

Конфликт интересов. Автор/авторы заявляет/заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author/authors declares/declare no conflict of interest.

• Источник финансирования

Информация о наличии или отсутствии финансирования указывается для всех статей. Пример оформления для статьи с авторским исследованием:

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке <...>.

Статьи, в которых содержится информация, не касающаяся непосредственно исследования, оформляются следующим образом:

Финансирование. Работа выполнена при поддержке <...>.

• Информированное согласие пациентов

Данный раздел необходим при публикации статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев. Авторы должны предоставить в редакцию письменное информированное согласие больного на распространение информации и сообщить об этом в статье:

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

• Соблюдение прав животных при проведении исследования

Пример оформления раздела:

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.

При несоответствии рукописи перечисленным требованиям, в рассмотрении статьи авторам будет отказано.

Общие положения

• Оплата публикации

Все статьи принимаются к печати бесплатно.

• Авторские права

Авторы, публикующие статьи в данном журнале, соглашаются на следующее:

Авторы сохраняют за собой авторские права и предоставляют журналу право первой публикации работы, которая по истечении 6 месяцев после публикации автоматически лицензируется на условиях Creative Commons Attribution License, которая позволяет другим распространять данную работу с обязательным сохранением ссылок на авторов оригинальной работы и оригинальную публикацию в этом журнале.

Авторы имеют право размещать свою работу в сети Интернет (например, в институтском хранилище или на персональном сайте) до и во время процесса рассмотрения ее данным журналом, так как это может привести к продуктивному обсуждению и большему количеству ссылок на данную работу (Cm. The Effect of Open Access).

• Приватность

Имена и адреса электронной почты, введенные на сайте этого журнала, будут использованы исключительно для целей, обозначенных этим журналом, и не будут использованы для каких-либо других целей или для предоставления другим лицам и организациям.

Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.

Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной. Корреспонденция с рецензентом ведётся через ответственного секретаря. После окончательного решения о принятии или отклонении работы все авторы получают электронное информационное письмо с уведомлением о прочтении.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

При обнаружении автором ошибок в статье до момента публикации или в случае, когда редактор сообщает автору, что получил сведения от третьей стороны о существенных ошибках в статье, автор обязан взаимодействовать с редактором журнала с целью скорейшего изъятия статьи из вёрстки и ее исправления.

Если ошибки обнаружены после выхода номера журнала, автор также обязан взаимодействовать с редактором и следовать его инструкциям по решению данного вопроса в индивидуальном порядке.

Авторы могут присылать свои материалы по электронной почте на адреса:

biotherapy_rbj@mail.ru или **rbjournal@ronc.ru**

Также статью можно подать через редакционную систему на сайте журнала.

11. Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Рукопись может быть возвращена авторам, если она им не соответствует.

1. Эта статья ранее не была опубликована, а также не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале (или дано объяснение этого в Комментариях для редактора).
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате документа OpenOffice, Microsoft Word, RTF или WordPerfect.
3. Приведены полные интернет-адреса (URL) для ссылок там, где это возможно.
4. Текст набран с полуторным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 12 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание (за исключением интернет-адресов).
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям, описанным в Руководстве для авторов, расположенном на странице «Журнале».
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то выполнены требования документа Обеспечение слепого рецензирования.

