

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

Российский Биотерапевтический Журнал
2024 • том 23 • № 1



**Russian Journal
of Biotherapy**

1

**ТОМ 23
2024**

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

1
ТОМ 23
'24

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

Адрес учредителя и редакции:
115478, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 2.

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

E-mail: biotherapy_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 Ю.Н. Бирюкова
Корректор Т.Н. Помилуйко
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.
2024. Том 23. № 1. 1–76.

© Оформление, верстка.

ООО «ИД «АБВ-пресс», 2024

Подписной индекс в каталоге агентства
«Роспечать» — 81679.

Отпечатано в типографии «Лайдер принт».

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, д.фарм.н., заведующая лабораторией химико-фармацевтического анализа ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, профессор кафедры фармации Института фармации им. П.А. Нелюбина 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, профессор кафедры фармации Института фармации им. П.А. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (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)

Курбатова Екатерина Алексеевна, д.м.н., профессор, заведующая лабораторией терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, 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 нанобиоинженерии 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 Наталья 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)

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

1 VOL. 23
'24

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 115478.

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 Yu.N. Biriukova
Proofreader T.N. Pomiluyko
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. 2024. Volume 23. No 1. 1–76.

© Design, layout PH "ABV-Press", 2024

Rospechat' catalogue index: 81679.
Printed at the Leader Print Ltd
Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane, Moscow 105082.

1,000 copies. Free distribution

<http://bioterapevt.elpub.ru>

EDITOR-IN-CHIEF

Kiselevskiy, Mikhail V., 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

Karaulov, Alexander V., 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)

Shprakh, Zoya S., PhD, DSc, Professor of Chair of Pharmacy, P.A. Nelyubin Institute of Pharmacy, Head of Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Analysis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 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

Sokolova, Zinaida A., 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

Balduueva, Irina A., 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)

Bunyatyan, Natalia D., PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Pharmacy, P.A. Nelyubin Institute of Pharmacy, 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)

Evseegneeva, Irina V., 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)

Krasnov, Viktor P., 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)

Kurbatova, Ekaterina A., PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Therapeutic Vaccines, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

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

Misyurin, Andrey V., PhD, DSc, General Director of LLC "Gene Technology" (Moscow, Russia)

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

Novikov, Viktor V., 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)

Oborotova, Natalia A., 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)

Pankratov, Andrey A., 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)

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

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

Sokolova, Tatiana M., 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)

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

Titov, Konstantin S., 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)

Ulasov, Ilya V., 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)

Estrin, Yuri Z., 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

Baryshnikova, Maria A., 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)

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

Demidov, Lev V., 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)

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

Kadagidze, Zaira G., 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)

Kosorukov, Vyacheslav S., 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)

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

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

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

*Е.Р. Немцова, Н.Б. Морозова, А.Д. Плютинская, А.Н. Ноев,
А.А. Панкратов, П.В. Шегай*

Комбретастатины А-4 и А-1 и их производные: обзор 10

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*К.М. Коноплина, А.А. Мальченкова, Н.А. Калинина, М.В. Пинюгина,
Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков*

**Определение циркулирующей опухолевой ДНК сингенной модели
меланомы В16-F10 в плазме мышей линии С57ВL6 19**

Я.Г. Муразов, Я.В. Агацарская, К.Л. Крышень

**Особенности роста меланомы В16 у мышей С57ВL/6 при использовании
различных методов получения опухолевого материала
и мест трансплантации сингенной опухоли 28**

*М.А. Майдин, М.Н. Юрова, Е.И. Федорос, П.В. Сергиев, С.Н. Алексахина,
Е.А. Отраднова, С.С. Круглов, Е.Н. Имянитов*

**Влияние инактивирующих гетерозиготных мутаций в генах репарации ДНК
на развитие экспериментального канцерогенеза легкого у мышей. 37**

В.А. Александров, А.Н. Стуков, Ю.Г. Змитриченко, О.А. Беляева, Г.В. Точильников

**Ингибирующий эффект ломустина на рост спонтанных HER2-позитивных
опухолей молочной железы у трансгенных мышей 45**

*Е.А. Курбатова, И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, Е.С. Петухова, И.Б. Семенова,
А.Е. Зайцев, Ю.В. Волох, А.Ю. Леонова, А.В. Поддубиков*

**Цитопатогенное действие нативного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae*
на клетки линии СНО-K1 51**

В.Б. Маркеев, С.В. Тишков, Е.В. Блынская, К.В. Алексеев

**Влияние твердых дисперсий с поливинилпирролидоном
на растворимость ГМЛ-3 58**

*Е.В. Игнатьева, М.Н. Краева, И.В. Ярцева, Д.В. Подымова, О.Л. Орлова,
Д.В. Гусев, Я.А. Поскедова, Т.М. Литвинова, З.С. Шпрах*

**Тест «Растворение» для контроля качества таблеток аналога соматостатина,
нерастворимого в воде 66**

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ 75

REVIEW

<i>Elena R. Nemtsova, Natalia B. Morozova, Anna D. Plyutinskaya, Alexey N. Noev, Andrey A. Pankratov, Peter V. Shegay</i>	
Combretastatins A-4 and A-1 and their derivatives: Review	10

ORIGINAL REPORTS

<i>Ksenia M. Konoplina, Anastasia A. Malchenkova, Nadezhda A. Kalinina, Marina V. Pinyugina, Ekaterina N. Kosobokova, Vyacheslav S. Kosorukov</i>	
Detection of circulating tumor DNA of B16-F10 melanoma syngenic model in C57BL6 mice plasma	19
<i>Iaroslav G. Murazov, Iana V. Agatsarskaya, Kirill L. Kryshen</i>	
B16 melanoma growth characteristic in C57BL/6 mice with various methods of obtaining tumor material and syngeneic tumor transplantation sites	28
<i>Mikhail A. Maydin, Maria N. Yurova, Elena I. Fedoros, Petr V. Sergiev, Svetlana N. Aleksakhina, Ekaterina A. Otradnova, Stepan S. Kruglov, Evgeny N. Imyanitov</i>	
Effect of inactivating heterozygous mutations in DNA repair genes on experimental lung carcinogenesis in mice	37
<i>Valerii A. Alexandrov, Alexander N. Stukov, Yuliya G. Zmitrichenko, Olesya A. Belyaeva, Grigory V. Tochilnikov</i>	
Inhibitory effect of lomustine on the growth of spontaneous HER2-positive mammary tumors in transgenic mice	45
<i>Ekaterina A. Kurbatova, Irina V. Yakovleva, Natalya F. Gavrilova, Ekaterina S. Petukhova, Irina B. Semenova, Anton E. Zaitsev, Yury V. Volokh, Anna Yu. Leonova, Alexander V. Poddubikov</i>	
Cytopathogenic effect of <i>Streptococcus pneumoniae</i> native pneumolysin in CHO-K1 cells	51
<i>Vladimir B. Markeev, Sergey V. Tishkov, Evgenia V. Blynskaya, Konstantin V. Alekseev</i>	
Effect of solid dispersions with polyvinylpyrrolidone on the solubility of GML-3	58
<i>Elena V. Ignatieva, Marina N. Kraeva, Irina V. Yartseva, Daria V. Podymova, Olga L. Orlova, Dmitriy V. Gusev, Yana A. Poskedova, Tatiana M. Litvinova, Zoya S. Shprakh</i>	
Test Dissolution for quality control of water-insoluble somatostatine analog	66
INFORMATION FOR AUTHORS	75

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-10-18>

Комбретастатины А-4 и А-1 и их производные: обзор

Е.Р. Немцова, Н.Б. Морозова, А.Д. Плютинская, А.Н. Ноев, А.А. Панкратов, П.В. Шегай

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский пр., 3

Контакты: Елена Романовна Немцова nemtzh@yandex.ru

В обзоре литературы рассмотрены результаты исследований различных ингибиторов тубулина (основного компонента микротрубочек), преимущественно колхициноподобных соединений – комбретастатинов А-4 и А-1 (СА-4 и СА-1). Представлены данные исследований SAR (structure activity relation), механизмов действия, оцененных в системах *in vitro* (на культурах опухолевых клеток) и *in vivo* (у животных с привитыми опухолями мышей и ксенографтами опухолей человека различного гистогенеза), охарактеризовано фосфатное производное комбретастатина А-4 как vascular disrupting agent (VDAs), описаны подходы к получению аналогов СА-4, стабильных в *cis*-конфигурации, и способы повышения гидрофильности перспективных производных при сохранении их высокой цитотоксичности. Приведены данные о результатах клинических испытаний СА-4Р и СА-1Р, назначаемых индивидуально или в комбинации с химиопрепаратами.

На основании анализа имеющихся результатов исследований производных комбретастатинов А-4 и А-1 сделан вывод об отсутствии среди них в настоящее время идеального водорастворимого вещества со стабильной *cis*-конфигурацией молекулы и высокой цитотоксической активностью, на основе которого можно создать активное противоопухолевое лекарственное средство.

Целью обзора является систематизация данных о противоопухолевой активности, путях модификации и возможностях терапевтического использования соединений на основе комбретастатинов (СА-4 и СА-1) и их производных.

Ключевые слова: комбретастатины А-4 и А-1, структура производных, ингибиторы тубулина, разрушающие сосуды агенты, доклинические и клинические исследования

Для цитирования: Немцова Е.Р., Морозова Н.Б., Плютинская А.Д. и др. Комбретастатины А-4 и А-1 и их производные: обзор. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):10–8. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-10-18>

Combretastatins A-4 and A-1 and their derivatives: Review

Elena R. Nemtsova, Natalia B. Morozova, Anna D. Plyutinskaya, Alexey N. Noev, Andrey A. Pankratov, Peter V. Shegay

P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute — branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy pr., Moscow 125284, Russia

Contacts: Elena Romanovna Nemtsova nemtzh@yandex.ru

This modern literature review covers the results of study of the tubulin inhibitors, mainly combretastatins A-4 and A-1 (CA-4 and CA-1) or colchicinoids. The article presents data of SAR (Structure Activity Relation) study of numerous CA-4 analogues as well as mechanisms of their action evaluated *in vitro* (using cultured tumor cells) and *in vivo* (using animals with transplanted murine tumors or with xenografts of human tumors of various histogenesis). The phosphate CA-4 derivative (CA-4P) is characterized as a vascular disrupting agent (VDAs). Approaches are described for developing CA-4 analogues stable in *cis*-configuration as well as methods for enhancing hydrophilicity of promising derivatives along with retention of their high cytotoxicity. The results of various clinical trials both of CA-4P and CA-1P administered individually or in combination with chemotherapeutic drugs are also presented. Our conclusion is that despite numerous studies performed during the last thirty years no ideal water-soluble molecule with stable *cis*-configuration and high cytotoxic activity has been obtained which could become the basis of an active anti-tumor medicine.

The aim of the review is to present the systematic data on antitumor activity of combretastatin CA-4 and CA-1 analogues as well as the modes of their modification and therapeutic usage.

Keywords: combretastatins A-4 and A-1, structure of derivatives, tubulin inhibitors, vascular disrupting agents, preclinical and clinical trials

For citation: Nemtsova E.R., Morozova N.B., Plyutinskaya A.D. et al. Combretastatins A-4 and A-1 and their derivatives: Review. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):10–8. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-10-18>

Введение

Основной биологический процесс, обуславливающий канцерогенез и развитие опухоли, — неконтролируемое деление клеток. Ключевую роль в клеточном цикле играют микротрубочки [1]. Они были открыты примерно 50 лет назад и к настоящему времени стали одной из основных мишеней противоопухолевой терапии [2, 3]. Микротрубочки являются основным компонентом скелета эукариотических клеток и играют существенную роль в делении и формировании клеток вследствие образования веретена деления, а также в обеспечении подвижности клеток и внутриклеточного транспорта. Цитоскелет микротрубочек представляет собой разветвленную сеть филаментов, пронизывающих внутреннюю часть клетки [3]. Несмотря на функциональную гетерогенность, микротрубочки имеют высококонсервативную структуру, которая построена из однотипных молекулярных блоков гетеродимеров α - и β -тубулина, взаимодействующих с образованием протофиламентов, которые латерально связываются и формируют микротрубочки. Эти динамичные структуры постоянно удлиняются и укорачиваются во всех фазах клеточного цикла за счет добавления и удаления гетеродимеров тубулина на концах микротрубочек, а их взаимодействие с окружающими белками регулирует стабильность и подвижность [4, 5].

Основной компонент этих структур — белок тубулин — содержит несколько различных центров связывания: таксановый, лаулималидный, винкаалкалоидный и колхициновый, названных в соответствии с соединениями, способными связываться с тубулином [6, 7]. Упомянутые молекулы являются антимитотическими агентами, которые ингибируют не только митоз, предотвращая образование веретена деления, но и осуществляют арест клеточного цикла в интерфазе по различным механизмам [8, 9].

Таксаны, включая паклитаксел и доцетаксел, связываются с полимеризованными микротрубочками, способствуют их стабилизации и таким образом нарушают их динамику [10]. Лаулималид действует аналогично таксанам, но связывается с другим центром на микротрубочках [11]. Винкаалкалоиды, включая винбластин, винкристин и винорелбин, способствуют деполимеризации микротрубочек [12, 13]. Как правило, они с высокой аффинностью связываются

с молекулами тубулина на верхушках микротрубочек, но не сополимеризуются с ними, и это препятствует полимеризации тубулина. Еще одна группа соединений, влияющих на функциональное состояние микротрубочек, представлена колхицином и подобными ему агентами, которые также вызывают деполимеризацию [14–17]. В отличие от соединений, которые связываются с тремя другими центрами, колхицин и подобные ему соединения способны взаимодействовать с β -тубулином, в норме сополимеризующимся с α -тубулином с образованием микротрубочек. Однако в результате взаимодействия с колхицином образуется изогнутый димер тубулина, который не способен выпрямляться вследствие стерического конфликта между колхицином и α -тубулином, что создает препятствие для формирования микротрубочек.

Хорошо известно, что в результате широкомасштабных исследований, проведенных в мире с момента открытия важнейшей роли микротрубочек в динамике клеточного цикла и, соответственно, деления клеток, доказано противоопухолевое действие таксанов [10] и винкаалкалоидов [17]. Вследствие этого в последние 30 лет внимание исследователей привлекают в основном колхициноподобные соединения [18–20].

Колхицин эффективно ингибирует митоз путем дестабилизации тубулина. Поскольку скорость входа в митоз опухолевых клеток выше, чем нормальных, представлялось, что он может служить противоопухолевым средством. Однако оказалось, что колхицин имеет низкий терапевтический индекс в результате его выраженных токсических свойств. Колхицин вызывает повреждение костного мозга, обуславливающее снижение кроветворения по обоим росткам — красному и белому, а также поражение органов желудочно-кишечного тракта.

Несмотря на то что колхицин не используется в качестве противоопухолевого средства, широко развиваются исследования по разработке соединений, способных эффективно связываться с колхициновым центром на микротрубочках и ингибировать процессы деления опухолевых клеток и васкуляризации опухолей. Многие агенты, находящиеся в настоящее время в разработке, доклинических исследованиях и клинических испытаниях, являются

природными или полусинтетическими соединениями — комбретастатинами. Благодаря структурному и функциональному сходству с колхицином они получили также название колхициноидов [20, 21].

Целью обзора является систематизация данных о противоопухолевой активности, путях модификации и возможностях терапевтического использования соединений на основе комбретастатинов (СА-4 и СА-1) и их производных.

Комбретастатины – ингибиторы полимеризации тубулина

Комбретастатины — это класс *cis*-стильбеновых фенолов, впервые выделенных из африканской ивы — *Combretum caffrum* — в 1970-х годах [22]. Комбретастин А-4 (СА-4) (рис. 1, а) является наиболее изученным природным соединением этого класса, обладающим способностью связываться с колхициновым центром тубулина и ингибировать его полимеризацию, что приводит к повреждению микротрубочек и аресту клеточного цикла в стадии митоза вследствие предотвращения образования веретена деления [21]. Благодаря этому механизму СА-4 проявляет высокую цитотоксическую активность в отношении культивируемых опухолевых клеток.

Другим комбретастином, изучаемым для медицинских целей, хотя и меньше, чем СА-4, является комбретастин А-1 (СА-1); рис. 1, б [23].

Однако природные комбретастатины, обладая липофильной структурой молекулы, очень слабо растворимы в водных средах, что сильно затрудняет разработку противоопухолевых препаратов на их основе и вынуждает исследователей искать более растворимые соединения — аналоги СА-4 и СА-1, не уступающие им в специфической активности.

Изучение зависимости функции СА-4 от структуры его молекулы (направление исследований, получившее название SAR Study — Structure Activity Relationship Study) позволило выяснить, что для оптимального проявления цитотоксической активности молекула комбретастатина или его аналога должна обладать тремя основными характеристиками: иметь *cis*-ориентацию обоих ароматических колец, 3,4,5-триметоксигруппы на кольце А и пара-метоксигруппу на кольце В [24, 25].

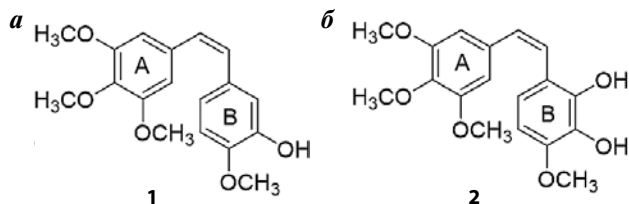


Рис. 1. Структуры молекул комбретастатина: а — СА-4; б — СА-1
Fig. 1. Structures of combretastatin: а — СА-4; б — СА-1

Низкая растворимость комбретастатинов в водных средах обуславливает их ограниченную биодоступность и быструю фармакокинетику в организме. Получение фосфорилированных молекул СА-4 и СА-1 (СА-4Р и СА-1Р соответственно) (рис. 2, а, б) является самым простым и очевидным способом улучшить растворимость комбретастатинов [25, 23]. СА-4Р и СА-1Р являются пролекарствами, которые в организме быстро дефосфорилируются с образованием активных цитотоксических молекул СА-4 и СА-1.

Недостатком СА-4 и СА-1 является также их способность в белковых средах изомеризоваться по олефиновой двойной связи из активной цитотоксической *cis*-конформации в соответствующую *trans*-неактивную форму, что значительно снижает их ценность в качестве активного компонента противоопухолевого препарата и накладывает существенные ограничения на их клиническое применение. Вместе с тем разнообразные подходы, включающие получение пролекарств, солей, структурных модификаций, предотвращение конверсии олефиновой двойной связи и включение заместителей в ароматические кольца молекул, привели к успешному синтезу многих аналогов и производных комбретастатинов, прежде всего СА-4, которые проявляют активность в отношении различных типов опухолевых клеток и ксенографтов в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [21, 26–29].

Комбретастатины – агенты, разрушающие сосуды

Наряду со способностью ингибировать образование микротрубочек и тем самым влиять на процессы деления клеток СА-4, СА-1 и их более растворимые

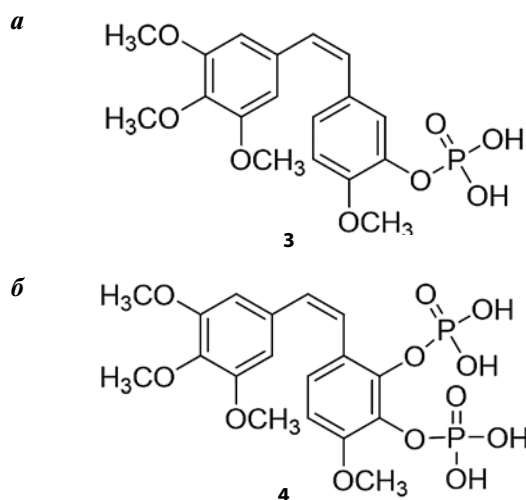


Рис. 2. Фосфорилированные производные комбретастатина: а — А-4 (СА-4Р); б — комбретастин А-1 (СА-1Р)

Fig. 2. Phosphorylated derivatives of combretastatin: а — А-4 (СА-4Р); б — А-1 (СА-1Р)

фосфатные формы — CA-4P и CA-1P — проявляют также антивазкулярную активность, что способствует их противоопухолевому действию [30–32].

Формирование кровеносных сосудов в опухоли (ангиогенез) играет ключевую роль в ее развитии и прогрессии. При этом вновь образованные опухолевые сосуды отличаются от нормальных по клеточному составу и строению, но благодаря этим отличиям внутриопухолевая сосудистая система, помимо снабжения ткани кислородом и питательными веществами, существенно влияет на развитие гипоксии в новообразовании и формирование путей метастазирования и, соответственно, привлекает внимание исследователей как мишень противоопухолевой терапии.

Существуют 2 подхода к терапии, которые нацелены на внутриопухолевую сосудистую сеть: 1-й — ингибирование процесса ангиогенеза, т.е. формирования новых сосудов; 2-й — специфическое воздействие на существующие опухолевые сосуды агентами, разрушающими сосуды (vascular disrupting agents — VDAs).

Известны 3 группы VDAs:

- 1) препараты, дестабилизирующие микротрубочки;
- 2) флавоноиды с антивазкулярными функциями;
- 3) препараты, мишенью которых являются рецепторы эндотелиальных клеток.

Применение стратегии разрушения внутриопухолевых сосудов приводит к повреждению сосудистой сети, необходимой для прогрессии злокачественного процесса — роста первичного опухолевого узла и метастазирования. Антивазкулярные агенты вызывают быструю и селективную блокировку сосудов в опухоли, что обуславливает ишемию, индуцирующую гибель опухолевых клеток.

Наиболее изученным агентом в этой терапевтической стратегии является фосфат комбретастина А-4 (CA-4P), относящийся к 1-й группе VDAs [33]. Несмотря на то, что механизм избирательного повреждения опухолевых сосудов изучен не до конца, существуют данные о том, что этот эффект CA-4P обусловлен морфологическими и функциональными изменениями в пролиферирующих эндотелиальных клетках в опухоли за счет разрушения их цитоскелета. В основе этого процесса, по-видимому, лежит тот же механизм, что и при остановке деления опухолевых клеток. После поступления пролекарства CA-4P в эндотелиальные клетки и его дефосфорилирования активное лекарственное вещество CA-4 связывается с тубулином в колхициновом центре, что приводит к деполимеризации тубулина. В результате подавляется образование микротрубочек в клетках опухолевых сосудов, что обуславливает изменение формы и отрыв незрелых пролиферирующих эндотелиальных клеток [34]. Это, в свою очередь, вызывает повышение проницаемости сосудов и вязкости

крови, а соответственно, и прокоагуляционные эффекты [35]. Увеличение давления интерстициальной жидкости приводит к повреждению незрелых сосудов. В противоположность этим процессам, происходящим в незрелых клетках, высокоразвитый актиновый скелет нормальных зрелых эндотелиальных клеток противостоит такому разрушению, несмотря на деполимеризацию тубулина в цитоскелете. Помимо этого, присутствие нормальных гладкомышечных клеток ингибирует разрыв контактов между нормальными эндотелиальными клетками. Быстрые и селективные эффекты CA-4P в отношении внутриопухолевой васкуляризации были показаны *in vivo* в опухолевых моделях на грызунах и у пациентов со злокачественными новообразованиями [36–42].

Выключение опухолевых сосудов вследствие описанных процессов происходит в течение 1 ч после введения CA-4P крысам с подкожными ксенографтами злокачественных опухолей [35, 37, 43], а также у пролеченных больных [41]. Максимальное снижение внутриопухолевого кровотока наблюдается через 4–6 ч после введения CA-4P как у животных с опухолями, так и у исследуемых больных, и в зависимости от дозы лекарственного средства сохраняется в течение 12–24 ч. На основании данных накопления радиомеченного йодантипирина у крыс с подкожными ксенографтами саркомы в течение 6 ч после введения CA-4P внутриопухолевый кровоток в центральной части опухоли был 100-кратно снижен по сравнению с таковым у контрольных животных, тогда как кровоток в сердце, почках и тонком кишечнике практически не был изменен. Через 24 ч после введения CA-4P отмечена гибель большинства опухолевых клеток у грызунов.

Необходимо отметить, что у онкопациентов наблюдали минимальные побочные эффекты CA-4P после его введения, что, по-видимому, обусловлено коротким периодом полужизни (не более 30 мин) и обратимыми механизмами действия CA-4P [44–46].

Однако быстрое изменение пространственной конфигурации CA-4 и CA-4P и переход их в неактивную *trans*-форму обусловили необходимость искать пути стабилизации молекулы в *cis*-конфигурации.

Аналоги CA-4

Большинство исследований по разработке аналогов CA-4 было направлено на модификацию *cis*-олефиновой связи с целью предотвращения трансформации молекулы в *trans*-форму путем введения гетероциклических групп или замены олефиновой связи другим линкером. Параллельно с модификацией олефиновой связи нередко в кольцо А или В вводили различные заместители. В некоторых работах исследователи ограничивались только модификацией бензольных колец [21].

Гетероциклы играют важную роль в различных лекарственных средствах и активно используются для придания перспективным молекулам необходимых свойств. В большинстве случаев молекула комбретастина А-4 была модифицирована путем замены олефиновой связи на 5-членный гетероцикл с получением пирролов, имидазолов, изоксазолов, тиазолов и других производных [21].

Большая серия соединений на основе 1-(3,4,5-триметилксифенил)-2-арил-1*H*-имидазола была получена международной группой ученых [21, 47]. Исследователями было изучено влияние различных заместителей фенила во 2-м положении имидазольного кольца на биологическую активность соединений. Показано, что введение хлора и этоксигруппы в *мета*- и *пара*-положения, соответственно, приводило к получению наиболее активного соединения **5** (рис. 3), ингибирующего полимеризацию тубулина и, следовательно, нарушающего сборку микротрубочек, IC_{50} которого в отношении опухолевых клеток человека 7 различных клеточных линий (HeLa — карцинома шейки матки, HT-29 — карцинома толстой кишки, A-549 — карцинома легкого, MCF7-аденокарцинома молочной железы, Jurkat — Т-лимфоциты первоначально из крови больного острым лимфобластным лейкозом, RS4; 11 — лимфобласты из крови больного острым лимфобластным лейкозом, HL-60 — клетки из крови больного острым миелобластным лейкозом) находилась в пределах 0,4–3,8 нМ.

В системе *in vivo* на модели сингенной опухоли мышей (меланома мыши BL6-B16) была подтверждена противоопухолевая активность соединения **5** в дозе, в 30 раз меньшей, чем доза СА-4, использованной в качестве контроля.

Продолжение исследований привело к синтезу различных молекул на основе 2-метил-4-(3,4,5-триметоксифенил)-5-замещенных оксазолов и связанных с ними 4-замещенных-5-(3,4,5-триметоксифенил) региоизомерных производных [48]. Большая

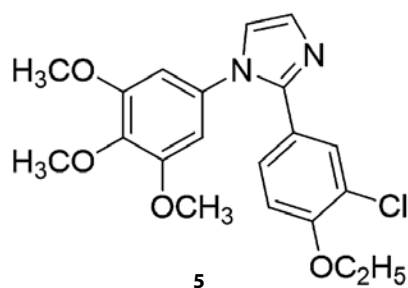


Рис. 3. Структура аналога комбретастина А-4 на основе *N*-замещенного имидазола (**5**), проявившего наибольшую активность в серии соединений, по данным [21]

Fig. 3. Structure of combretastatin A-4 analogue on the basis of *N*-substituted imidazole (**5**) with the most pronounced activity in the series of compounds according to data of [21]

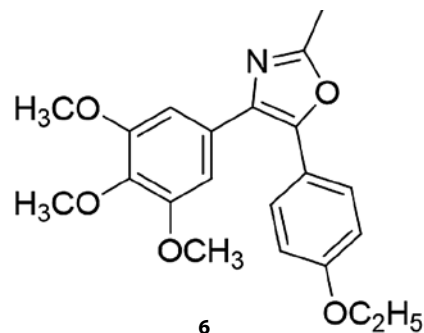


Рис. 4. Структура аналога комбретастина А-4 на основе 2-метилоксазола (**6**), проявившего наибольшую активность в серии соединений, по данным [48]

Fig. 4. Structure of combretastatin A-4 analogue on the basis of 2-methyl-oxazole (**6**) with the most pronounced activity in the series of compounds according to data of [48]

панель синтезированных соединений была протестирована для оценки их антипролиферативной активности, взаимодействия с тубулином, влияния на клеточный цикл в системе *in vitro* на культивируемых опухолевых клетках человека 7 линий, а также в системе *in vivo* для оценки противоопухолевой активности.

Соединение **6**, содержащее *n*-этоксифенильную группу в 5-м положении 2-метилоксазольного кольца (рис. 4), обладало IC_{50} 0,5–20,2 нМ в отношении исследованных опухолевых клеток и связывалось с колхициновым центром тубулина, ингибируя его полимеризацию в субмикромольных концентрациях. Более того, оно выраженно индуцировало апоптоз по митохондриальному пути, а в системе *in vivo* на сингенной модели опухоли мышей (меланома мыши BL6-B16) существенно ингибировало рост опухоли в дозе, в 10 раз меньшей, чем СА-4 на той же модели [48].

Группой российских ученых по оригинальной методике также синтезирована серия аналогов СА-4 путем замещения олефиновой двойной связи гетероциклами, в ряде соединений дополненного введением заместителей в кольцо В [29].

Анализ цитотоксической активности полученных соединений на опухолевых клетках человека (A549 — карцинома легкого, PC-3 — аденокарцинома предстательной железы) позволил выявить наиболее активные из них — 4-(4-метоксифенил)-5-(3,4,5-триметоксифенил) изоксазол (**7**) и 3-(3,4,5-триметоксифенил)-4-(4-метоксифенил)изоксазол (**8**), с $IC_{50} \approx 8$ нМ (рис. 5, а, б) [49].

Из сказанного очевидно, что методы медицинской химии позволяют синтезировать множество ингибиторов полимеризации тубулина — аналогов СА-4, которые превышают по цитотоксической активности природное соединение — комбретастин А-4 — и обладают другими преимуществами по сравнению с ним [50]. Однако модификация молекулы СА-4 по

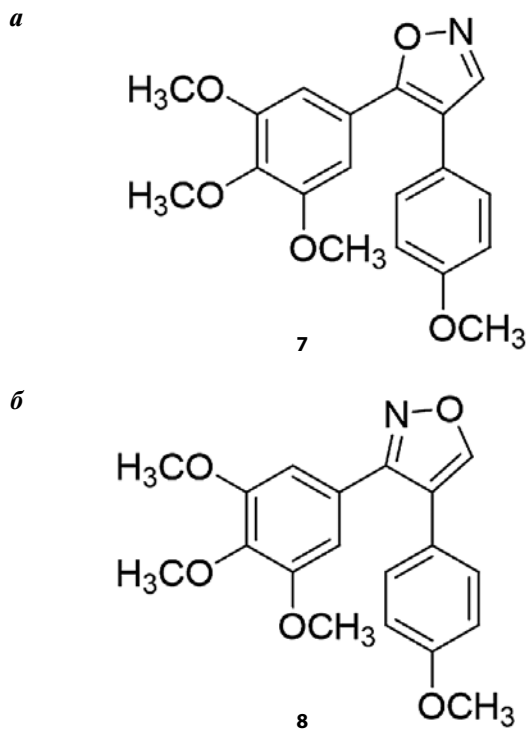


Рис. 5. Структуры аналогов комбретастина А-4 (7) и (8) (а, б), проявивших наибольшую активность в серии соединений, по данным [49]

Fig. 5. Structures of combretastatin A-4 analogues (7) and (8) (a, б) with the most pronounced activity in the series of compounds according to data of [49]

олефиновой связи не приводит к изменению очень важного для медицинского применения свойства — его растворимости в водных биологических средах [51–54]. Именно поэтому исследования продолжают в направлении создания активных водорастворимых молекул, отвечающих требованиям современной фармацевтики.

Как правило, растворимость соединений в водных средах можно повысить путем подбора соответствующей лекарственной формы или химической модификацией структуры молекулы. Недостатком первого пути может явиться повышение токсичности лекарственного средства вследствие необходимости добавления небезопасных вспомогательных веществ, способствующих растворению, поэтому химическая модификация самой молекулы представляется более предпочтительной.

Предпринятые усилия преодолеть низкую растворимость СА-4 привели к получению нескольких растворимых соединений — пролекарств, среди которых динатриевая соль фосфата СА-4 (СА-4Р, fosbretabulin, Zybrestat™), соль аминокислоты AVE8062 (ombrabulin, Sanofi-Aventis, аналог СА-4) и OXi4503 — фосфат комбретастина А1 (СА-1Р), которые получили разрешение на клинические испытания [55, 23].

Клинические испытания СА-4Р и СА-1Р

В 2003 г. фосфат СА-4 (СА-4Р, fosbretabulin, Zybrestat™) был одобрен FDA (США) и ЕМА (Европейское медицинское агентство) в качестве орфанного препарата для лечения больных анапластическим раком щитовидной железы. Несколько других аналогов СА-4 и СА-1 проходят доклиническое изучение в качестве противоопухолевых агентов, а 3 препарата (fosbretabulin, OXi4503, AVE8062) находятся на клинических испытаниях в рамках протоколов сочетанного применения с доцетакселом и другими химиопрепаратами.

В испытаниях I фазы СА-4Р вводили внутривенно однократно, в организме пролекарство быстро дефосфорилировалось и вызывало снижение кровотока в опухоли [25]. Полученный у больных эффект коррелировал с действием СА-4Р в качестве VDA, детектированным в доклинических испытаниях у животных [3, 43]. Разрушение сосудов опухоли приводит к прекращению снабжения опухолевых клеток кислородом и питательными веществами, что обуславливает их гибель. Клинические данные показали, что СА-4Р является короткоживущим — период его полужизни не превышает 30 мин. Он быстро выводится из кровотока, что способствует его хорошей переносимости.

Учитывая его антисосудистый эффект, предположили, что наибольшего эффекта можно ожидать при лечении больных с хорошо васкуляризированными опухолями [56]. Вследствие этого дальнейшие клинические испытания II фазы были проведены у больных анапластической карциномой щитовидной железы [57]. Однако в этом исследовании не удалось добиться увеличения общей и безрецидивной выживаемости, поэтому исследование было прекращено в 2007 г.

При оценке результатов комбинированной терапии (СА-4Р, карбоплатин, паклитаксел) в рамках III фазы клинических испытаний у больных анапластической карциномой щитовидной железы было выявлено, что пролекарство СА-4Р увеличивало общую выживаемость больных по сравнению с группой сравнения без СА-4Р на фоне приемлемого профиля токсичности. Однако поставленная цель двукратного увеличения медианы выживаемости не была достигнута [58]. По-видимому, быстрая трансформация молекулы в *trans*-форму, в 100 раз менее активную, чем *cis*-форма, обусловила недостаточно выраженный терапевтический эффект. Это предположение стимулировало синтез аналогов, модифицированных по двойной олефиновой связи, описанных выше, а также последнее исследование, описанное в литературе к настоящему моменту [59].

Параллельно в Великобритании проведено клиническое исследование IA-фазы, направленное на изучение безопасности и эффективности применения

препарата ОХi4503 (СА-1Р) для лечения острого миелобластного лейкоза [23]. Результаты этого пилотного исследования показали, что препарат имеет приемлемый профиль токсичности и, по предварительным данным, проявляет терапевтическую эффективность.

Однако задача получения высокоактивного водорастворимого аналога СА-4, сохраняющего *cis*-конфигурацию молекулы в биологических средах, по-прежнему оставалась весьма актуальной.

Группой китайских ученых проведено интересное исследование, позволившее в значительной степени приблизиться к решению этой задачи [59]. Первоначально к молекуле СА-4 была присоединена аминогруппа в кольцо В, а затем цианогруппа по олефиновой связи с получением соединения **9a**, что, с одной стороны, сделало структуру нитрилостильбена более устойчивой, а с другой стороны, еще менее водорастворимой (рис. 6, а). Поскольку это соединение содержит аминогруппу в кольце В, которая достаточно реакционноспособна, была получена серия производных с присоединенным пиперазиновым кольцом с различными заместителями и оценено их влияние на растворимость соединений.

Наиболее растворимыми оказались соединения **9b** и **9c** (см. рис. 6, в, з), растворимость которых в воде превышала таковую у соединения **9a** (см. рис. 6, а) примерно в 1700 и 2500 раз соответственно. Однако изменение структуры молекулы с целью увеличения ее гидрофильности снижало цитотоксическую активность соединений.

Тщательное сравнение свойств полученных соединений позволило сделать вывод о том, что молекула **9b** (см. рис. 6, в) является наиболее перспективной для использования ее в качестве активного компонента при разработке лекарственного средства. Тем не менее исследователи справедливо заключают, что требуется провести полноценные доклинические испытания этого вещества, прежде чем его можно будет рекомендовать для клинического изучения.

Заключение

В обзоре представлены современные данные о комбретастинах А4 и А1, путях их модификации

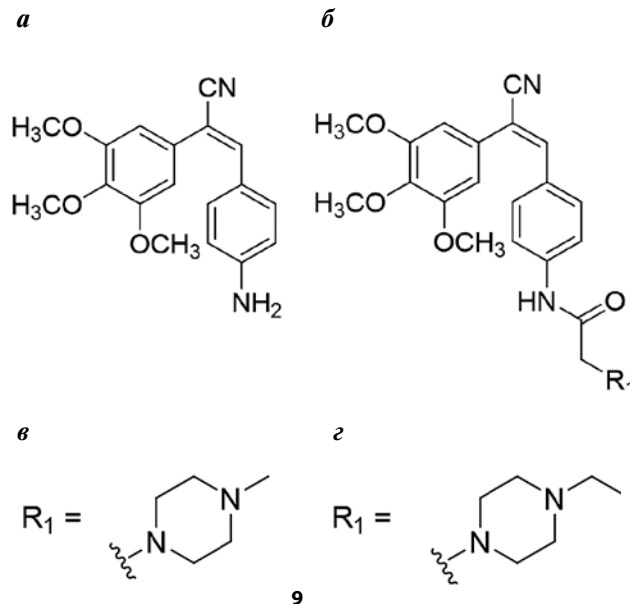


Рис. 6. Структуры водорастворимых аналогов комбретастина А-4 (а–з), по данным [59]

Fig. 6. Structures of water-soluble combretastatin A-4 analogues (a–z) according to data of [59]

и получении производных с различной структурой молекул, связи ее с цитотоксичностью. Рассмотрены также возможности использования аналогов комбретастинов для создания активного противоопухолевого средства. Обсуждены недостатки комбретастинов как гидрофобных соединений и их структурные особенности — переход из активной *cis*-формы в неактивную *trans*-форму в биологических средах, который диктует необходимость синтезировать новые более активные соединения.

К сожалению, приходится констатировать, что, несмотря на многолетние разнообразные исследования, проведенные в области синтеза и изучения аналогов комбретастинов А-4 и А-1, к настоящему моменту не получено водорастворимой молекулы с высокой цитотоксической активностью, полностью отвечающей требованиям фармацевтики в плане создания биодоступного противоопухолевого лекарственного средства на ее основе.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ong J.Y., Torres J.Z. Phase separation in cell division. *Mol Cell* 2020;80(1):9–20. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.08.007
2. Akhmanova A., Steinmetz M.O. Control of microtubule organization and dynamics: Two ends in the limelight. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015;16(12):711–26. DOI: 10.1038/nrm4084
3. Janke C., Magiera M.M. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21(6):307–26. DOI: 10.1038/s41580-020-0214-3
4. Steinmetz M.O., Prota A.E. Microtubule-targeting agents: Strategies to hijack the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2018;28(10):776–92. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.05.001
5. Goodson H.V., Jonasson E.M. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10(6):a022608. DOI: 10.1101/cshperspect.a022608
6. Vindya N.G., Sharma N., Yadav M., Ethiraj K.R. Tubulins — the target for anticancer therapy. *Curr Top Med*

- Chem 2015;15(1):73–82.
DOI: 10.2174/1568026615666150112115805
7. Parker A.L., Teo W.S., McCarroll J.A., Kavallaris M. An emerging role for tubulin isotypes in modulating cancer biology and chemotherapy resistance. *Int J Mol Sci* 2017;18(7):1434. DOI: 10.3390/ijms18071434
 8. Cheng Z., Lu X., Feng B. A review of research progress of antitumor drugs based on tubulin targets. *Transl Cancer Res* 2020;9(6):4020–27. DOI: 10.21037/tcr-20-682
 9. Zhou X., Xu Z., Li A. et al. Double-sides sticking mechanism of vinblastine interacting with α , β -tubulin to get activity against cancer cells. *J Biomol Struct Dyn* 2019;37(15):4080–91. DOI: 10.1080/07391102.2018.1539412
 10. Mosca L., Ilari A., Fazi F. et al. Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Drug Resist Updat* 2021;54:100742. DOI: 10.1016/j.drug.2020.100742
 11. Castro-Alvarez A., Pineda O., Villarrasa J. Further insight into the interactions of the cytotoxic macrolides Lauimalide and Peloruside A with their common binding site. *ACS Omega* 2018;3(2):1770–82. DOI: 10.1021/acsomega.7b01723
 12. Martino E., Casamassima G., Castiglione S. et al. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorg Med Chem Lett* 2018;28(17):2816–26. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.06.044
 13. Tang S., Zhou Z., Jiang Z. et al. Indole-based tubulin inhibitors: binding modes and SARs investigations. *Molecules* 2022;27(5):1587. DOI: 10.3390/molecules27051587
 14. Lu Y., Chen J., Xiao M. et al. An Overview of tubulin Inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm Res* 2012;29(11):2943–71. DOI: 10.1007/s11095-012-0828-z
 15. Kumar A., Sharma P.R., Mondhe D.M. Potential anticancer role of colchicine-based derivatives: An overview. *Anticancer Drugs* 2017;28(3):250–62. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000464
 16. McLoughlin E.C., O'Boyle N.M. Colchicine-binding site inhibitors from chemistry to clinic: A review. *Pharmaceuticals* 2020;13(1):8. DOI: 10.3390/ph13010008
 17. Dhyani P., Quispe C., Sharma E. et al. Anticancer potential of alkaloids: A key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. *Cancer Cell International* 2022;22(1):206. DOI: 10.1186/s12935-022-02624-9
 18. Jaroch K., Karolak M., Górski P. et al. Combretastatins: *In vitro* structure-activity relationship, mode of action and current clinical status. *Pharmacol Rep* 2016;68(6):1266–75. DOI: 10.1016/j.pharep.2016.08.007
 19. Johnson L., Goping I.S., Rieger A. et al. Novel colchicine derivatives and their anti-cancer activity. *Curr Top Med Chem* 2017;17(22):2538–58. DOI: 10.2174/1568026617666170104143618
 20. Karatoprak G.S., Akkol E.K., Genç Y. et al. Combretastatins: An overview of structure, probable mechanisms of action and potential applications. *Molecules* 2020;25(11):2560. DOI: 10.3390/molecules25112560
 21. Seddigi Z.S., Malik M.S., Saraswati A.P. et al. Recent advances in combretastatin based derivatives and prodrugs as antimetabolic agents. *Med Chem Comm* 2017;8(8):1592–603. DOI: 10.1039/c7md00227k
 22. Li W., Sun H., Xu S. et al. Tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site: A perspective of privileged structures. *Future Med Chem* 2017;9(15):1765–94. DOI: 10.4155/fmc-2017-0100
 23. Cogle C.R., Collins B., Turner D. et al. Safety, feasibility and preliminary efficacy of single agent combretastatin A1 diphosphate (OXI4503) in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 2020;189(5):e194–221. DOI: 10.1111/bjh.16629
 24. Song M.Y., He Q.R., Wang Y.L. et al. Exploring diverse-ring analogues on combretastatin A4 (CA-4) olefin as microtubule-targeting agents. *Int J Mol Sci* 2020;21(5):1817. DOI: 10.3390/ijms21051817
 25. Siemann D.W., Chaplin D.J., Walicke P.A. A review and update of the current status of the vasculature disabling agent combretastatin-A4 phosphate (CA4P). *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(2):189–97. DOI: 10.1517/13543780802691068
 26. Nainwal L.M., Alam M.M., Shaquiquzzaman M. et al. Combretastatin-based compounds with therapeutic characteristics: A patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2019;29(19):703–31. DOI: 1080/13543776.2019.1651841
 27. Piekuś-Slomka N., Mikstacka R., Ronowicz J., Sobiak S. Hybrid *cis*-stilbene molecules: Novel anticancer agents. *Int J Mol Sci* 2019;20(6):1300. DOI: 10.3390/ijms20061300
 28. Hura N., Sawant A.V., Kumari A. et al. Combretastatin-inspired heterocycles as antitubulin anticancer agents. *ACS Omega* 2018;3(8):9754–69. DOI: 10.1021/acsomega.8b00996
 29. Каприн А.Д., Шерай П.В., Немцова Е.Р. и др. Способ получения 4,5-диарилазолов. Патент РФ № 2799312, рег. 4 июля 2023 г. Каприн А.Д., Шерай П.В., Немцова Е.Р. et al. Method of 4,5-diarylazoles synthesis. Patent RF № 2799312, reg. 4 July 2023.
 30. Tozer G.M., Prise V.E., Wilson J. et al. Combretastatin A-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: Early effects in tumors and normal tissues. *Cancer Res* 1999;59(7):1626–34. PMID: 10197639
 31. Galbraith S.M., Chaplin D.J., Lee F. et al. Effects of combretastatin A4 phosphate on endothelial cell morphology in vitro and relationship to tumour vascular targeting activity in vivo. *Anticancer Res* 2001;21(1A):93–102. PMID: 11299795
 32. Vincent L., Kermani P., Young L.M. et al. Combretastatin A-4 phosphate induces rapid regression of tumor neovessels and growth through interference with vascular endothelial cadherin signaling. *J Clin Invest* 2005;115(11):2992–3006. DOI: 10.1172/JCI24586
 33. Tozer G., Prise V.E., Wilson J. et al. Mechanisms associated with tumor vascular shut-down induced by combretastatin A-4 phosphate: Intravital microscopy and measurement of vascular permeability. *Cancer Res* 2001;61(17):6413–22. PMID: 11522635
 34. Kanthou C., Tozer G.M. The tumor vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces reorganization of the actin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells. *Blood* 2002;99(6):2060–9. DOI: 10.1182/blood.v99.6.2060
 35. Thoeny H.C., De Keyser F., Vandecaveye V. et al. Effect of vascular targeting agent in rat tumor model: dynamic contrast-enhanced versus diffusion-weighted MR imaging. *Radiology* 2005;237(2):492–9. DOI: 10.1148/radiol.2372041638
 36. Dark G.G., Hill S.A., Prise V.E. et al. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Research* 1997;57(10):1829–34. PMID: 9157969
 37. Wang H., Sun X., Chen F. et al. Treatment of rodent liver tumor with combretastatin A4 phosphate: noninvasive therapeutic evaluation using multiparametric magnetic resonance imaging in correlation with microangiography and histology. *Invest Radiol* 2009;44(1):44–53. DOI: 10.1097/RLI.0b013e31818e5ace
 38. Smolarczyk R., Czapla J., Jarosz-Biej M. et al. Vascular disrupting agents in cancer therapy. *Eur J Pharm* 2021;891:173692. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173692
 39. Bi R., Balasundaram G., Jeon S. et al. Photoacoustic microscopy for evaluating combretastatin A4 phosphate induced vascular disruption in orthotopic glioma. *J Biophotonics* 2018;11(10):e201700327. DOI: 10.1002/jbio.201700327
 40. Fruytier A.C., Le Du C.S., Po C. et al. The blood flow shutdown induced by combretastatin A4 impairs gemcitabine delivery in a mouse hepatocarcinoma. *Front Pharmacol* 2016;7:506. DOI: 10.3389/fphar.2016.00506
 41. Dowlati A., Robertson K., Cooney M. et al. A phase I pharmacokinetic and translational study of the novel vascular targeting agent combretastatin A-4 phosphate on a single-dose intravenous schedule in patients with advanced cancer. *Cancer Research* 2002;62(12):3408–16. PMID: 12067983

42. Anderson H., Yap J., Miller M. et al. Assessment of pharmacodynamic vascular response in a phase I trial of combretastatin A4 phosphate. *J Clin Oncol* 2003;21(15):2823–30. DOI: 10.1200/JCO.2003.05.186
43. Abma E., Daminet S., Smets P. et al. Combretastatin A4-phosphate and its potential in veterinary oncology: A review. *Vet Comp Oncol* 2017;15(1):184–93. DOI: 10.1111/vco.12150
44. Grisham R., Ky B., Tewari K.S. et al. Clinical trial experience with CA4P anticancer therapy: Focus on efficacy, cardiovascular adverse events, and hypertension management. *Gyn Oncol Res Pract* 2018;5:1. DOI: 10.1186/s4066-017-0058-5
45. Mooney C.J., Nagaiah G., Fu P. et al. A phase ii trial of fosbretabulin in advanced anaplastic thyroid carcinoma and correlation of baseline serum-soluble intracellular adhesion molecule-1 with outcome. *Thyroid* 2009;19(3):233–40. DOI: 10.1089/thy.2008.0321
46. Rustin G.J., Galbraith S.M., Anderson H. et al. Phase I clinical trial of weekly combretastatin A4 phosphate: Clinical and pharmacokinetic results. *J Clin Oncol* 2003;21(15):2815–22. DOI: 10.1200/JCO.2003.05.185
47. Romagnoli R., Baraldi P.G., Precipe F. et al. Design and synthesis of potent *in vitro* and *in vivo* anticancer agents based on 1-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-2-aryl-1H-imidazole. *Sci Rep* 2016;6:26602. DOI: 10.1038/srep26602
48. Romagnoli R., Baraldi P.G., Precipe F. et al. Synthesis and biological evaluation of 2-methyl-4,5-disubstitutedoxazoles as a novel class of highly potent antitubulin agents. *Sci Rep* 2017;7:46356. DOI: 10.1038/srep46356
49. Plyutinskaya A.D., Nemtsova E.R., Pankratov A.A. et al. Cytostatic activity of combretastatin A-4 derivatives in an *in vitro* system. *Bull Exp Biol Med* 2022;174(2):221–5. DOI: 10.1007/s10517-023-05677-6
50. Faustino C., Francisco A.P., Isca V.M., Neelia D. Cytotoxic stilbenes and derivatives as promising antimitotic leads for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2018;24(36):4270–311. DOI: 10.2174/138161282566619011123959
51. Oliva P., Romagnoli R., Cacciari B. et al. Synthesis and biological evaluation of highly active 7-anilino triazolopyrimidines as potent antimicrotubule agents. *Pharmaceutics* 2022;14(6):1191. DOI: 10.3390/pharmaceutics14061191
52. González M., Ellahioui Y., Álvarez R. et al. The masked polar group incorporation (MPGI) strategy in drug design: Effects of nitrogen substitutions on combretastatin and isocombretastatin tubulin inhibitors. *Molecules* 2019;24(23):4319. DOI: 10.3390/molecules24234319
53. Mustafa M., Anwar S., Elgamel F. et al. Potent combretastatin A-4 analogs containing 1,2,4-triazole: Synthesis, antiproliferative, anti-tubulin activity, and docking study. *Eur J Med Chem* 2019;183:111697. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111697
54. O'Boyle N.M., Ana G., Kelly P.M. et al. Synthesis and evaluation of antiproliferative microtubule-destabilising combretastatin A-4 piperazine conjugates. *Org Biomol Chem* 2019;17(25):6184–200. DOI: 10.1039/c9ob0058g
55. Eskens F.A., Tresca P., Tosi D. et al. A phase I pharmacokinetic study of the vascular disrupting agent ombrabulin (AVE8062) and docetaxel in advanced solid tumours. *Br J Cancer* 2014;110(9):2170–7. DOI: 10.1038/bjc.2014.137
56. Yeung S.C., She M., Yang H. et al. Combination chemotherapy including combretastatin A-4 phosphate and paclitaxel is effective against anaplastic thyroid cancer in a nude mouse xenograft model. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(8):2902–9. DOI: 10.1210/jc.2007-0027
57. Sosa J.A., Elisei R., Jarzab B. et al. Randomized safety and efficacy study of fosbretabulin with paclitaxel/carboplatin against anaplastic thyroid carcinoma. *Thyroid* 2014;24(2):232–40. DOI: 10.1089/thy.2013.0078
58. Qian C., Jiang L., Xu S. et al. Advances in targeted therapy for anaplastic thyroid carcinoma. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2021;50(6):685–93. DOI: 10.3724/zdxbyxb-2021-0249
59. Chen Z.-H., Xu R.-M., Zheng G.-H. et al. Development of combretastatin A-4 analogues as potential anticancer agents with improved aqueous solubility. *Molecules* 2023;28(4):1717. DOI: 10.3390/molecules28041717

Вклад авторов

Е.Р. Немцова: концепция и методология, анализ данных, подготовка текста, редактирование статьи;
 Н.Б. Морозова: методология, анализ данных, подготовка текста, редактирование статьи;
 А.Д. Плютинская: методология, анализ данных, редактирование статьи;
 А.Н. Ноев: программное обеспечение, редактирование статьи;
 А.А. Панкратов: обеспечение ресурсов, администрирование проекта, анализ данных, редактирование статьи;
 П.В. Шерай: обеспечение ресурсов, администрирование проекта, редактирование статьи.

Author's contributions

E.R. Nemtsova: conceptualization, methodology, data analysis, writing and editing of the manuscript;
 N.B. Morozova: methodology, data analysis, writing and editing of the manuscript;
 A.D. Plyutinskaya: methodology, data analysis, editing of the manuscript;
 A.N. Noev: software, editing of the manuscript;
 A.A. Pankratov: resources, project administration, data analysis, editing of the manuscript;
 P.V. Shegay: resources, project administration, editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.Р. Немцова / E.R. Nemtsova: <https://orcid.org/0000-0002-3579-1733>
 Н.Б. Морозова / N.B. Morozova: <https://orcid.org/0000-0002-7159-805X>
 А.Д. Плютинская / A.D. Plyutinskaya: <https://orcid.org/0000-0002-6898-2931>
 А.Н. Ноев / A.N. Noev: <https://orcid.org/0000-0003-2245-4946>
 А.А. Панкратов / A.A. Pankratov: <https://orcid.org/0000-0001-7291-9743>
 П.В. Шерай / P.V. Shegay: <https://orcid.org/0000-0001-9755-1164>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 11.10.2023. **Принята в печать:** 05.02.2024.

Article received: 11.10.2023. **Accepted for publication:** 05.02.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-19-27>

Определение циркулирующей опухолевой ДНК сингенной модели меланомы B16-F10 в плазме мышей линии C57BL6

К.М. Коноплина, А.А. Мальченкова, Н.А. Калинина, М.В. Пинюгина, 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

Введение. Циркулирующая в плазме крови опухолевая ДНК (цоДНК) является потенциальным маркером для мониторинга опухолевого процесса. Однако возможность использования мышиной сингенной подкожной модели меланомы для оценки уровня цоДНК остается неясной.

Цель исследования – оценка уровня детектируемой цоДНК в мышиной сингенной модели меланомы B16-F10 методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР).

Материалы и методы. Для количественного определения цоДНК из клеток B16-F10 в плазме крови был разработан и валидирован метод цкПЦР. Для получения экспериментальных опухолей мышам линии C57BL6 подкожно вводили суспензию клеток линии мышиной меланомы B16-F10. Через день, на 7-, 14- и 21-й дни после перевивки опухоли у мышей отбирали кровь из ретроорбитального синуса. Из плазмы крови выделяли циркулирующую ДНК. На 21-й день после перевивки опухоли животных выводили из эксперимента.

Результаты. Разработан и валидирован метод цкПЦР для детекции цоДНК в сингенной модели меланомы B16-F10 у мышей линии C57BL6. Аналитический сигнал линейен в диапазоне 0,5–32 копии/мкл, значение R^2 составило 0,997. Эмпирический предел обнаружения цоДНК составил 1 копия/мкл в присутствии 5 нг геномной ДНК нормальной ткани. Значения коэффициента вариации состояли в диапазоне от 44,5 % (для 1 копии/мкл) до 16,6 % (16 копий/мкл). Циркулирующая опухолевая ДНК в сингенной модели меланомы B16-F10 у мышей линии C57BL6 достоверно детектируется на 21-й день после перевивки опухолевых клеток ($p = 0,004$). Уровень цоДНК коррелирует с объемом опухоли ($p = 0,95$, $p = 0,05$) и уровнем циркулирующей ДНК ($p = 1$, $p = 0,0$).

Заключение. Мышиная сингенная подкожная модель меланомы B16-F10 может использоваться для мониторинга уровня цоДНК при исследовании новых подходов для лечения меланомы.

Ключевые слова: цифровая капельная полимеразная цепная реакция, мышиная модель меланомы, B16-F10, циркулирующая опухолевая ДНК

Для цитирования: Коноплина К.М., Мальченкова А.А., Калинина Н.А. и др. Определение циркулирующей опухолевой ДНК сингенной модели меланомы B16-F10 в плазме мышей линии C57BL6. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):19–27. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-19-27>

Detection of circulating tumor DNA of B16-F10 melanoma syngenic model in C57BL6 mice plasma

Ksenia M. Konoplina, Anastasia A. Malchenkova, Nadezhda A. Kalinina, Marina V. Pinyugina, 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

Background. Plasma circulating tumor DNA (ctDNA) is a potential marker for tumor process monitoring. However, the feasibility of using mouse syngeneic subcutaneous melanoma model to assess ctDNA levels remains unclear.

Aim. To evaluate the feasibility of ctDNA detection in mouse B16-F10 melanoma model using droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR).

Materials and methods. We developed and validated a ddPCR assay to quantify plasma ctDNA from B16-F10 cells. To form experimental tumors, C57BL6 mice were inoculated with B16-F10 cells. On the first, 7th, 14th, 21st days after

tumor inoculation blood was collected by retroorbital sinus puncture. ctDNA was extracted from blood plasma. On the 21st day after tumor inoculation mice were sacrificed.

Results. We validated a ddPCR assay to quantify plasma ctDNA in B16-F10 melanoma syngeneic model in C57BL6 mice. The assay linear range was 0.5–32 copies/ul, $R^2 = 0.997$. The empirical limit of detection of ctDNA was 1 copy/ul in 5 ng normal tissue genomic DNA background. The coefficient of variation values ranged from 44.5 % (1 copy/ul) to 16.6 % (16 copies/ul). Plasma ctDNA was detected on 21st day after tumor inoculation in B16-F10 melanoma syngeneic subcutaneous model ($p = 0.004$). ctDNA concentration positively correlated with tumor volume ($\rho = 0.95$, $p = 0.05$) and total circulating DNA concentration ($\rho = 1$, $p = 0.0$).

Conclusion. B16-F10 melanoma syngeneic subcutaneous model in C57BL6 mice can be used to monitor cDNA in studies of new approaches for melanoma treatment.

Keywords: digital droplet polymerase chain reaction, mouse melanoma model, B16-F10, circulating tumor DNA

For citation: Konoplina K.M., Malchenkova A.A., Kalinina N.A. et al. Detection of circulating tumor DNA of B16-F10 melanoma syngenic model in C57BL6 mice plasma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):19–27. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-19-27>

Введение

Циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК) как один из вариантов жидкостной биопсии имеет большой потенциал стать биомаркером для мониторинга динамики опухолевого процесса при меланоме. Результаты доклинических исследований [1] с участием пациентов, больных меланомой, показали, что с помощью цоДНК возможно прогнозировать выживаемость больных, обнаруживать минимальную остаточную болезнь и ранний рецидив, проводить мониторинг ответа и прогнозировать ответ на таргетную терапию и иммунотерапию, выявлять варианты, ассоциированные с резистентностью, подбирать лекарственную терапию.

Для изучения возможностей цоДНК как биомаркера используют различные животные экспериментальные модели. Так, с помощью сложных доклинических моделей опухолей с использованием кроликов [2, 3], PDX-мышей [4], ортотопических мышинных ксенографтов [5], генно-инженерных мышей [6] оценивали возможность применения указанных моделей для детекции и мониторинга цоДНК при определенном виде рака. При исследовании фундаментальных механизмов и кинетики выделения цоДНК в кровь широко используются ксенографтные мышинные модели опухолей [7–11].

Сингенные мышинные модели опухолей представляют собой опухоли, полученные из мышинных опухолевых клеток, перевитых подкожно либо ортотопически иммунокомпетентным мышам генетически идентичного штамма. Такие модели являются относительно простыми и недорогими и широко используются в доклинических исследованиях противоопухолевых препаратов и поиске биомаркеров в области иммунотерапии [12]. Однако возможность использования мышинной сингенной подкожной модели для оценки уровня цоДНК остается неясной.

Сингенная подкожная модель мышинной меланомы B16-F10 используется в доклинических исследо-

ваниях для изучения локального роста опухоли и развития спонтанных метастазов. Ранее для данной модели были выявлены соматические мутации, присутствующие только в опухолях и отсутствующие в нормальной ткани [13], в рамках разработки биоинформатического подхода для предсказания иммуногенных пептидов как компонентов потенциальных персонализированных противоопухолевых вакцин. С помощью выявленных мутаций были предсказаны и синтезированы соответствующие неоантигенные пептиды. Иммуногенность и противоопухолевый эффект вакцин на основе полученных пептидов оценивали на мышинной модели меланомы B16-F10. Показано, что неоантигенные пептидные вакцины в сочетании с адъювантом Poly (I:C) вызывают стимуляцию клеточного иммунного ответа, что, однако, не во всех случаях приводило к развитию противоопухолевого ответа [14]. Исследование иммуногенности отдельных неоантигенных пептидов обнаружило, что иммуногенность *in vivo* не коррелирует с рейтингом, полученным в результате биоинформатического анализа [15].

Циркулирующая опухолевая ДНК рассматривается как потенциальный биомаркер ответа на персонализированную противоопухолевую иммунотерапию [16]. Для оценки ответа на персонализированную иммунотерапию на основе как отдельных неоантигенных пептидов, так и их комбинаций в модели мышинной меланомы B16-F10 было необходимо оценить возможность использования данной мышинной модели для детекции и мониторинга уровней цоДНК.

Цель исследования — оценка уровня детектируемой цоДНК в мышинной сингенной модели меланомы B16-F10 методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР).

Материалы и методы

Клеточная культура. Клеточную линию мышинной меланомы B16-F10 из биоресурсной коллекции

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки Hyclone (GE Healthcare, США) при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ до достижения 80 % монослоя. Перед экспериментом клеточную линию проверяли на контаминацию микоплазмой с помощью набора MycoReport («Евроген», Россия). Для введения мышам готовили суспензию с концентрацией 2 млн клеток в 1,0 мл среды 199 («ПанЭко», Россия) без добавок.

Получение подкожной модели меланомы B16-F10.

Опыты, проводимые на животных, выполнены в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, от 1986 г. Протоколы опытов утверждены на заседании локального этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

В эксперименте использовали мышей линии C57Bl6 — самок возрастом 6–7 нед весом 20–26 г — из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животные содержались на стандартном гранулированном сухом корме. Животных разделили на две группы:

- 1-я группа (контроль) — мыши без опухоли, которым вводили подкожно в правый бок 0,5 мл среды 199 ($n = 4$);
- 2-я группа — мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10, которым вводили подкожно в правый бок 1 млн опухолевых клеток в 0,5 мл среды 199 ($n = 10$).

После появления у животных пальпируемых опухолей проводили измерение размеров опухолей (длина, ширина, высота) с помощью калипера. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле [17]:

$$V = a \times b \times c \times \frac{\pi}{6},$$

где V — объем опухоли (мм³), a — длина опухоли (мм), b — ширина опухоли (мм), c — высота опухоли (мм).

На 21-й день после перевивки опухоли животных выводили из эксперимента, собирали образцы опухолевой ткани и нормальной ткани кожи (ухо). Полученные образцы ткани хранили при температуре –80 °C до выделения геномной ДНК (гДНК).

Получение крови и выделение плазмы. Забор крови осуществляли из ретроорбитального синуса через день, на 7-, 14- и 21-й дни после перевивки опухоли с помощью пастеровской пипетки, обработанной этилендиаминтетрауксусной кислотой — ЭДТА (0,5 М, pH 8,55) в физиологическом растворе («ПанЭко», Россия). Кровь помещали в пробирки, содержащие 8 мкл 0,5 М ЭДТА, инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и центрифугировали

при 1700 g в течение 15 мин. Из полученной плазмы сразу выделяли циркулирующую ДНК (цДНК).

Выделение ДНК. Из образцов плазмы выделяли цДНК с помощью набора PME free-circulating DNA Kit (Analytik Jena, Германия). Из биоматериала опухоли и нормальной ткани выделяли геномную ДНК с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Германия). Непосредственно после выделения определяли концентрацию цДНК и гДНК с помощью флуориметра Qubit 4.0 и набора Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Качество выделенной ДНК определяли с помощью нанофотометра NP 80 (Implen, Германия) по соотношению оптического поглощения на длинах волн 260/280 и 260/230. Образцы выделенной ДНК хранили при температуре –20 °C.

Цифровая капельная полимеразная цепная реакция.

Для детекции цДНК использовали набор праймеров и TaqMan-зондов, специфичных для варианта chr7:109894747T>G в гене *Dennd5a* (замена p.D1250A), ранее выявленного в качестве соматической мутации, возникающей в сингенной модели мышинной меланомы B16-F10 [13] и подтвержденной методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов: прямой праймер 5'-TCAGAGGTCAGATGTCAATG-3', обратный праймер 5'-GCCTGTGTCTTTCTTTTCCC-3', TaqMan-зонд на референсную последовательность 5'-HEX-ACATGTATGAGGACGTGGCGCTG-BHQ1-3', TaqMan-зонд на мутантную последовательность 5'-FAM-ACATGTATGAGGCCGTGGCGCTG-BHQ1-3'.

Цифровую капельную ПЦР проводили на платформе QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, США). Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 1x смесь ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (Bio-Rad, США), 0,8 мкМ смеси праймеров, 0,4 мкМ каждого TaqMan-зонда и 1–8,3 мкл геномной или цДНК либо смеси геномной и плазмидной ДНК.

Подбор условий амплификации цифровой капельной полимеразной цепной реакции. Для подбора оптимальной температуры отжига праймеров и TaqMan-зондов проводили цкПЦР с гДНК опухолевого материала и нормальной ткани (кожи) в температурном градиенте при условиях амплификации: 95 °C, 10 мин; 40 циклов при 94 °C, 30 с — градиент 52 °C — 62 °C, 1 мин; 98 °C, 10 мин.

Оценка параметров цифровой капельной полимеразной цепной реакции. Анализ линейности аналитического сигнала, эмпирическое определение чувствительности (предела обнаружения), оценку точности (повторяемости, промежуточной прецизионности) проводили с помощью серии разведений плазмиды, содержащей последовательность гена *Dennd5a* с мутацией, на фоне 5 нг гДНК нормальной мышинной ткани.

Количественное определение циркулирующей опухолевой ДНК. При количественном определении цоДНК в экспериментальных образцах использовали контроли: без матрицы (вода без нуклеаз), положительный (смесь плазмиды с мутацией и гДНК нормальной ткани), отрицательный (геномная ДНК нормальной ткани). Анализ полученных капель проводили с помощью программного обеспечения QuantaSoft версии 1.7.4 (Bio-Rad, США). Количество копий цДНК с мутацией, суммарно содержащееся в элюате, нормировали на объем плазмы, из которого была выделена цДНК.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel и языка Python. Данные со смещенным и нормальным распределением представлены в виде медианы $\pm$ межквартильный размах и среднего $\pm$ стандартное отклонение соответственно. Для анализа различий между медианными значениями уровней мутантной цДНК в контрольной и экспериментальной группах использовали критерий Манна–Уитни ($\alpha = 0,05$).

Для анализа корреляции объема опухоли и количества цоДНК, количества общей цДНК и цоДНК использовали критерий Спирмена.

Результаты и обсуждение

Метод цифровой капельной полимеразной цепной реакции для количественного определения циркулирующей опухолевой ДНК. При разработке метода цкПЦР для количественного определения цоДНК использовали набор праймеров и TaqMan-зондов, специфичных для варианта chr7:109894747T>G в гене *Dennd5a* (замена p.D1250A), ранее выявленного в качестве соматической мутации, возникающей в сингенной модели мышинной меланомы B16-F10 [13]. Подбор оптимальной температуры отжига осуществляли с помощью температурного градиента. Температура отжига, при которой наблюдалось максимальное расстояние между кластерами капель при наименьшем количестве неспецифичных капель, составила 60,1 °C (рис. 1) и использовалась в последующих экспериментах.

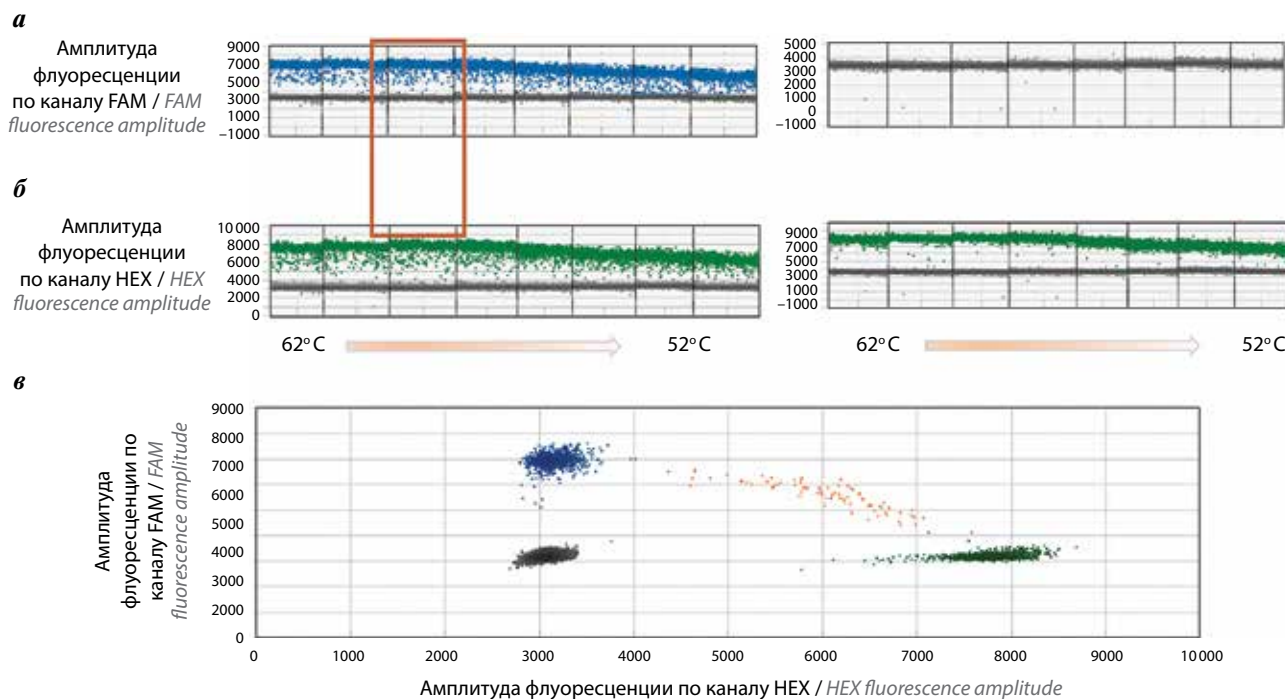


Рис. 1. Подбор оптимальной температуры отжига праймеров и Taq-зондов: а, б — одномерные графики амплитуд флуоресценции капель, содержащих геномную ДНК опухолевой и нормальной мышинной ткани соответственно при различных температурах отжига; при температуре 60,1 °C (выделено оранжевым цветом) расстояние между кластерами капель было максимальным, количество неспецифичных капель — минимальным для образцов геномной ДНК опухолевой и нормальной ткани; в — двухмерный график амплитуд флуоресценции капель, содержащих геномную ДНК опухолевой мышинной ткани, при температуре отжига 60,1 °C. Цветовое обозначение капель: серые — не содержат ДНК-матрицу; синие — содержат только ДНК-матрицу с мутацией (FAM); зеленые — содержат только ДНК-матрицу дикого типа (HEX); оранжевые — содержат ДНК-матрицы и с мутацией, и дикого типа

Fig. 1. Optimizing primers and TaqMan probes annealing temperature: а, б — 1-D fluorescence amplitude plots of droplets containing genomic DNA from mouse tumor tissue and mouse normal tissue, respectively, at different annealing temperatures; at a temperature of 60.1 °C (highlighted in orange), the distance between droplet clusters was maximum, and the number of nonspecific droplets was minimum for genomic DNA samples of tumor and normal tissue; в — 2-D fluorescence amplitude plot of droplets containing genomic DNA of tumor mouse tissue at an annealing temperature of 60.1 °C. Droplets color designation: gray — double-negative droplets containing no targeted DNA templates; blue — droplets containing only mutant DNA template (FAM); green — droplets containing only wild-type DNA template (HEX); orange — double-positive droplets containing both wild-type and mutant DNA templates

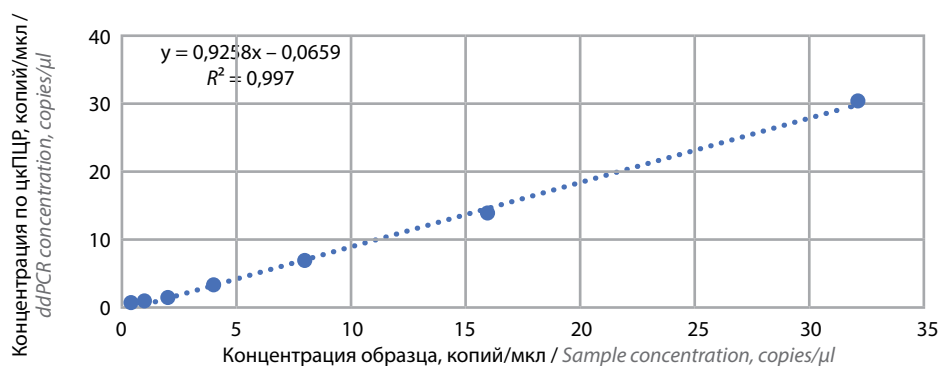


Рис. 2. Линейность аналитического сигнала. По оси абсцисс — расчетные значения концентраций (копий/мкл) по цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР), по оси ординат — средние экспериментальные значения концентраций (не менее трех повторов)

Fig. 2. Linearity of the analytical signal. Theoretical concentration values (copies/ μ l) are on the abscissa axis, mean digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR) concentration values (minimum three replications) are on the ordinate axis

Для определения линейности аналитического сигнала проводили регрессионный анализ с помощью программного пакета Microsoft Excel. Аналитический сигнал линейен в диапазоне 0,5–32 копии/мкл, значение R^2 составило 0,997 (рис. 2). Значение линейности $R^2 > 0,99$ соответствует требованию стандарта ISO 20395:2019 (Е).

Предел обнаружения цоДНК определяли эмпирически относительно верхней планки погрешности отрицательного контроля (гДНК нормальной ткани). Предел обнаружения составил 1 копию/мкл в присутствии 5 нг гДНК нормальной ткани (рис. 3).

Для оценки промежуточной прецизионности метода рассчитывали коэффициенты вариации (см. таблицу). Значения коэффициента вариации состояли в диапазоне от 44,5 % (для 1 копии/мкл) до 16,6 % (16 копий/мкл).

Разработанный и валидированный метод цкПЦР позволяет достоверно определять абсолютное количество копий ДНК с соматической мутацией в гене *Dennd5a*, возникающей в сингенной подкожной модели мышинной меланомы B16-F10, с точностью до 1 копии в 1 мкл реакционной смеси.

Определение уровня циркулирующей опухолевой ДНК в плазме. В сингенной модели меланомы B16-F10 у мышей линии C57Bl6 цоДНК достоверно детектируется на 21-й день после перевивки опухолевых клеток по сравнению с контролем ($p = 0,004$; рис. 4).

Уровень цДНК в экспериментальной группе незначимо отличается от такового в контрольной группе на протяжении 21 дня роста опухоли (для 21 дня $p = 0,07$; рис. 5).

Уровень цоДНК положительно коррелирует с объемом опухоли (рис. 6) и уровнем общей цДНК (рис. 7).

Клеточная линия мышинной меланомы B16-F10 имеет наименьшее время удвоения среди линий

клеток B16 [18] и наибольший метастатический потенциал [19]. Сингенная подкожная модель мышинной меланомы на основе клеточной линии B16-F10 широко используется для изучения метастазирования и образования опухолей.

Ранее было показано, что в мышинной подкожной модели меланомы B16-F10 циркулирующие опухолевые клетки детектируются на 4-е сутки после подкожной перевивки опухолевых клеток [20]. Полученные нами результаты показали, что цоДНК достоверно детектировалась на 21-е сутки после перевивки опухолевых клеток. Отсутствие детектируемых уровней цоДНК на ранних этапах роста опухоли может быть обусловлено разными причинами.

Так, уровень неопухолевой цДНК достоверно не отличался от такового в контрольной группе на протяжении 21 дня эксперимента (см. рис. 5). На мышинной ксенографтной модели рака легкого было показано, что точность определения мутантного варианта в цДНК зависит от концентрации общей цДНК [10]. При низких значениях общей цДНК более вероятно получить ложный отрицательный результат. Возможно, мы наблюдали низкие значения неопухолевой цДНК, поскольку образцы полученной цДНК были контаминированы гДНК, не отделенной по причине одного этапа центрифугирования во время пробоподготовки [21]. Помимо того, на уровень детектируемой цоДНК мог повлиять тип используемых опухолевых клеток. I. Labгаа и соавт. [11] на мышинной ксенографтной модели гепатоцеллюлярной карциномы показали, что выброс цоДНК в кровоток отличается для различных клеточных линий. На момент написания статьи авторам не известны литературные данные о способности различных типов клеток B16 высвобождать цоДНК.

Механизмы выделения цоДНК в кровоток до конца не изучены, и существующие в настоящее

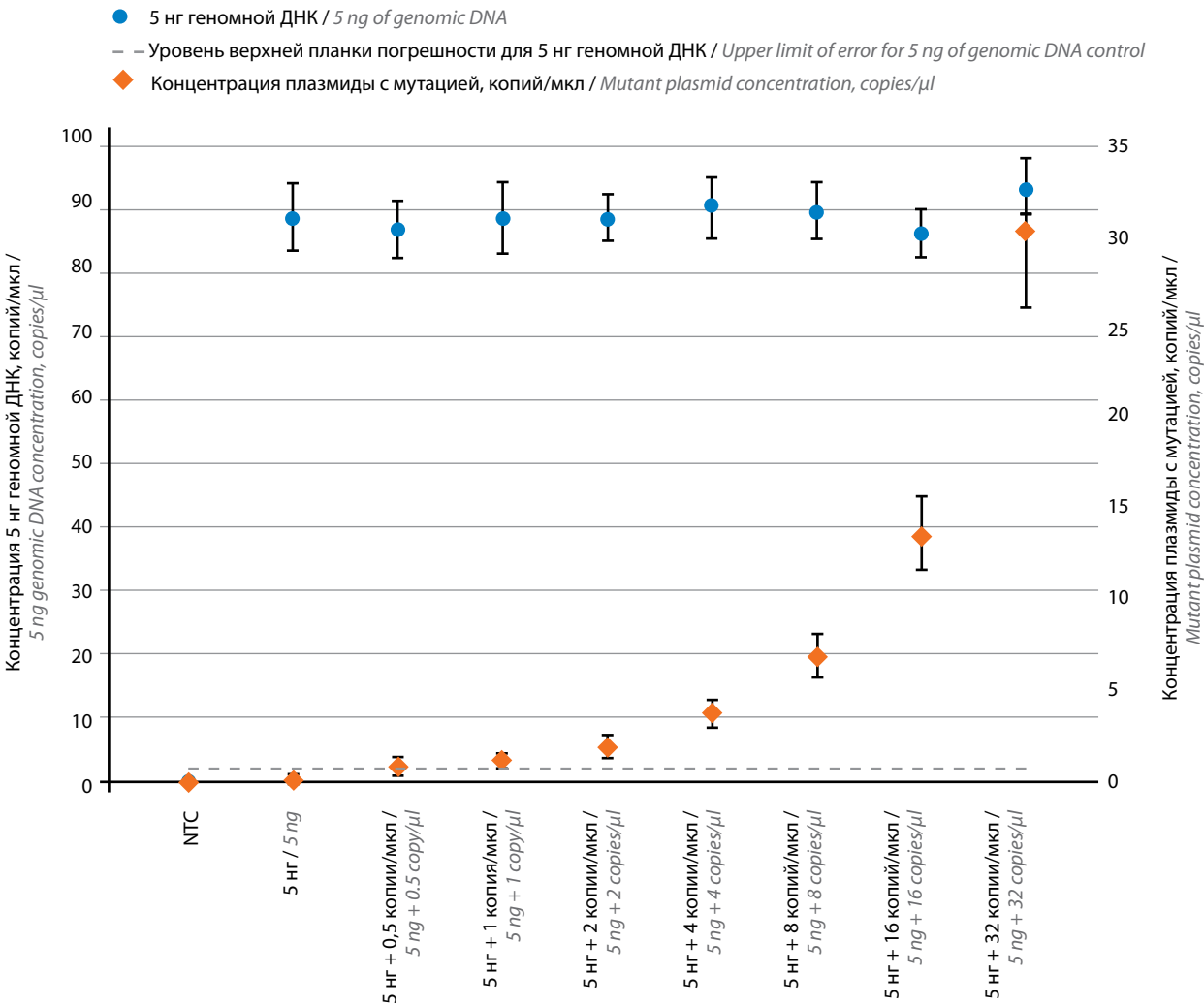


Рис. 3. Эмпирическое определение предела обнаружения с помощью серии разведений плазмиды, содержащей мутантный вариант, на фоне 5 нг геномной ДНК нормальной ткани. Данные представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение (не менее двух повторов)
Fig. 3. Empirical determination of limit of detection using serial dilutions of a plasmid with mutation variant in *Dennd5a* gene in 5 ng normal tissue genomic DNA. Data are presented as mean ± standard deviation (minimum two replications)

Промежуточная прецизионность метода цифровой капельной полимеразной цепной реакции для обнаружения циркулирующей опухолевой ДНК меланомы B16-F10
Between-run precision of droplet digital polymerase chain reaction assay for B16-F10 melanoma circulating tumor DNA detection

Образец Sample	Среднее значение, копий/мкл Mean value, copies/ul	Коэффициент вариации, % Coefficient of variation, %
5 нг + 1 копия/мкл 5 ng + 1 copy/μl	1,0	44,5
5 нг + 2 копии/мкл 5 ng + 2 copies/μl	1,9	38,0
5 нг + 4 копии/мкл 5 ng + 4 copies/μl	3,5	25,9
5 нг + 8 копий/мкл 5 ng + 8 copies/μl	6,9	16,1
5 нг + 16 копий/мкл 5 ng + 16 copies/μl	13,4	16,6

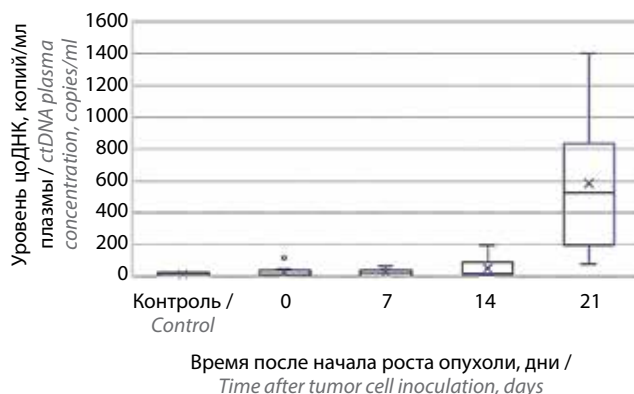


Рис. 4. Уровни циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК) в плазме крови мышей

Fig. 4. Mice blood plasma circulating tumor DNA (ctDNA) levels

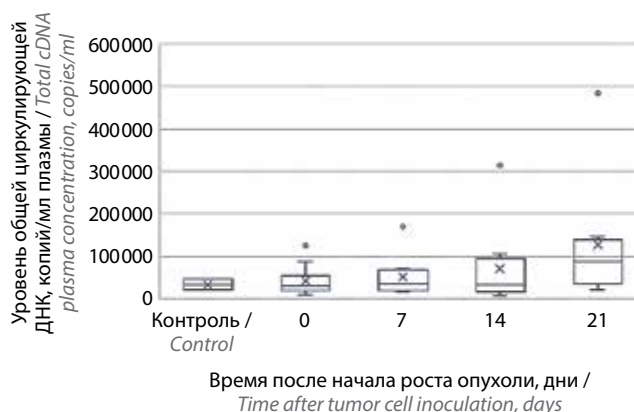


Рис. 5. Уровни общей циркулирующей ДНК в плазме крови мышей

Fig. 5. Mice blood plasma total circulating DNA levels

время технические подходы не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для обнаружения цоДНК на ранних стадиях развития опухоли [22]. Тем не менее полученные нами результаты показали возможность достоверного определения уровня цоДНК в мышинной подкожной модели меланомы B16-F10. При корректировке протокола выделения цДНК из крови возможна детекция цоДНК на более ранних стадиях.

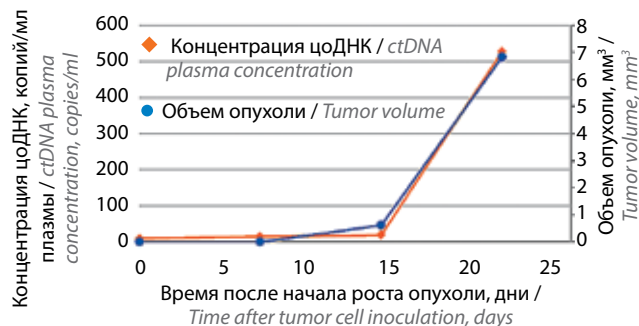


Рис. 6. Корреляция уровня цоДНК и объема опухоли ($\rho = 0,95$, $p = 0,05$). Данные представлены в виде медианных значений (не менее двух повторов)

Fig. 6. Circulating tumor DNA and tumor volume correlation ($\rho = 0,95$, $p = 0,05$). Data are presented as median values (minimum two replicates)

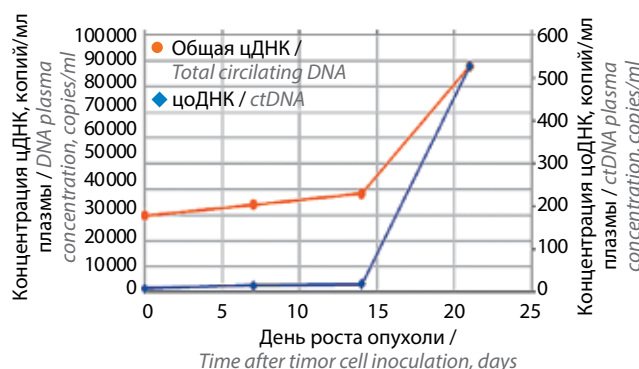


Рис. 7. Корреляция уровня цоДНК и общей цДНК ($\rho = 1$, $p = 0,0$). Данные представлены в виде медианных значений (не менее двух повторов)

Fig. 7. Circulating tumor DNA and total circulating DNA correlation ($\rho = 1$, $p = 0,0$). Data are presented as median values (minimum two replicates)

Закключение

Разработанный метод цкПЦР позволяет выявлять цоДНК у мышей линии C57Bl6 с моделью сингенной подкожной меланомы B16-F10 и может использоваться для мониторинга уровня цоДНК при изучении динамики роста опухоли на фоне таргетной и иммунотерапии, детекции рецидивов и остаточной опухоли.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tivey A., Britton F., Scott J.-A. et al. Circulating tumour DNA in melanoma – clinic ready? *Curr Oncol Rep* 2022;24(3):363–73. DOI: 10.1007/s11912-021-01151-6
2. Bustamante P., Tsering T., Coblenz J. et al. Circulating tumor DNA tracking through driver mutations as a liquid biopsy-based biomarker for uveal melanoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2021;40(1):196. DOI: 10.1186/s13046-021-01984-w
3. Muhanna N., Eu D., Chan H.H.L. et al. Cell-free DNA and circulating tumor cell kinetics in a pre-clinical head and neck cancer model undergoing radiation therapy. *BMC Cancer* 2021;21(1):1075. DOI: 10.1186/s12885-021-08791-8
4. Ruhen O., Lak N.S.M., Stutterheim J. et al. Molecular characterization of circulating tumor DNA in pediatric

- rhbdomyosarcoma: A feasibility study. *JCO Precis Oncol* 2022;6:e2100534. DOI: 10.1200/PO.21.00534
5. Eun Y.-G., Yoon Y.J., Won K.Y., Lee Y.C. Circulating tumor DNA in saliva in an orthotopic head and neck cancer mouse model. *Anticancer Res* 2020;40(1):191–9. DOI: 10.21873/anticancer.13940
 6. Rakhit C.P., Trigg R.M., Le Quesne J. et al. Early detection of pre-malignant lesions in a KRAS^{G12D}-driven mouse lung cancer model by monitoring circulating free DNA. *Dis Model Mech* 2019;12(2):dmm.036863. DOI: 10.1242/dmm.036863
 7. Thierry A.R., Mouliere F., Gongora C. et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res* 2010;38(18):6159–75. DOI: 10.1093/nar/gkq421
 8. Terasawa H., Kinugasa H., Nouse K. et al. Circulating tumor DNA dynamics analysis in a xenograft mouse model with esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2021;27(41):7134–43. DOI: 10.3748/wjg.v27.i41.7134
 9. Gasparello J., Allegretti M., Tremante E. et al. Liquid biopsy in mice bearing colorectal carcinoma xenografts: Gateways regulating the levels of circulating tumor DNA (ctDNA) and miRNA (ctmiRNA). *J Exp Clin Cancer Res* 2018;37(1):124. DOI: 10.1186/s13046-018-0788-1
 10. Wei L., Xie L., Wang X. et al. Circulating tumor DNA measurement provides reliable mutation detection in mice with human lung cancer xenografts. *Lab Invest* 2018;98(7):935–46. DOI: 10.1038/s41374-018-0041-8
 11. Labgaa I., von Felden J., Craig A.J. et al. Experimental models of liquid biopsy in hepatocellular carcinoma reveal clone-dependent release of circulating tumor DNA. *Hepatol Commun* 2021;5(6):1095–105. DOI: 10.1002/hep4.1692
 12. Olson B., Li Y., Lin Y. et al. Mouse models for cancer immunotherapy research. *Cancer Discov* 2018;8(11):1358–65. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-0044
 13. Косоруков В.С., Барышникова М.А., Кособоква Е.Н. и др. Выявление иммуногенных мутантных неоантигенов в геноме меланомы мышей. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(3):23–30. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-23-30
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
 14. Барышникова М.А., Рудакова А.А., Соколова З.А. и др. Оценка противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для создания 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
 15. 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
 16. Stadler J.-C., Belloum Y., Deitert B. et al. Current and future clinical applications of ctDNA in immuno-oncology. *Cancer Res* 2022;82(3):349–58. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-1718
 17. Tomayko M.M., Reynolds C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;24(3):148–54. DOI: 10.1007/BF00300234
 18. Danciu C., Falamas A., Dehelean C. et al. A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. *Cancer Cell Int* 2013;13:75. DOI: 10.1186/1475-2867-13-75
 19. Nicolson G.L., Brunson K.W., Fidler I.J. Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Res* 1978;38(11 Pt 2):4105–11. PMID: 359132
 20. Nedosekin D.A., Sarimollaoglu M., Ye J.-H. et al. *In vivo* ultrafast photoacoustic flow cytometry of circulating human melanoma cells using near-infrared high-pulse rate lasers. *Cytometry A* 2011;79(10):825–33. DOI: 10.1002/cyto.a.21102
 21. Herrera L.J., Raja S., Gooding W.E. et al. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. *Clin Chem* 2005;51(1):113–8. DOI: 10.1373/clinchem.2004.039263
 22. Sánchez-Herrero E., Serna-Blasco R., Robado de Lope L. et al. Circulating tumor DNA as a cancer biomarker: An overview of biological features and factors that may impact on ctDNA analysis. *Front Oncol* 2022;12:943253. DOI: 10.3389/fonc.2022.943253

Вклад авторов

К.М. Коноплина: разработка дизайна исследования, получение, обработка, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование текста рукописи;

А.А. Мальченкова: предоставление материалов исследования, получение, обработка, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;

Н.А. Калинина, М.В. Пинюгина: предоставление материалов исследования, редактирование текста рукописи;

Е.Н. Кособоква: разработка концепции и дизайна исследования, написание и редактирование текста рукописи;

В.С. Косоруков: разработка концепции и дизайна исследования, редактирование текста рукописи.

Authors contributions

K.M. Konoplina: study design development, acquisition, processing, analysis and interpretation of data, original draft preparation and editing;

A.A. Malchenkova: research materials provision, acquisition, processing, analysis and interpretation of data, original draft preparation;

N.A. Kalinina, M.V. Pinyugina: research materials provision, editing of manuscript;

E.N. Kosobokova: study concept and design development, review and editing;

V.S. Kosorukov: study concept and design development, editing of manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.М. Коноплина / K.M. Konoplina: <https://orcid.org/0000-0003-0130-2628>

А.А. Мальченкова / A.A. Malchenkova: <https://orcid.org/0000-0003-2201-0472>

Н.А. Калинина / N.A. Kalinina: <https://orcid.org/0000-0002-3024-8918>

М.В. Пинюгина / M.V. Pinyugina: <https://orcid.org/0000-0003-0318-3896>

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.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках научно-исследовательской работы № 075-15-2021-1060 «Создание и развитие биоресурсной коллекции генетически и фенотипически охарактеризованных клеточных линий и первичных опухолей человека», а также при поддержке НИР № 1022040600453-9-3.2.21;3.4.2.

Funding. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of research work No 075-15-2021-1060 “Creation and development of a bioresource collection of genetically and phenotypically characterized human cell lines and primary tumors” and also this research was funded by the grant No 1022040600453-9-3.2.21;3.4.2.

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. Протоколы опытов были утверждены на заседании локального этического комитета НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

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. The protocols of the experiments were approved at a meeting of the local ethical committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.

Статья поступила: 25.10.2023. Принята в печать: 28.01.2024.

Article received: 25.10.2023. Accepted for publication: 28.01.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-28-36>

Особенности роста меланомы B16 у мышей C57BL/6 при использовании различных методов получения опухолевого материала и мест трансплантации сингенной опухоли

Я.Г. Муразов, Я.В. Агацарская, К.Л. Крышень

АО «Научно-производственное объединение «Дом фармации»; Россия, 188663 Ленинградская обл., Всеволожский район, г. п. Кузьмолловский, ул. Заводская, 3

Контакты: Ярослав Геннадьевич Муразов yaroslav84@yandex.ru

Введение. В неклинических исследованиях противоопухолевых средств использование различных источников получения опухолевого материала и мест трансплантации существенно влияет на параметры роста сингенных опухолей, на их инвазивный потенциал и профиль метастазирования.

Цель исследования – оценить кинетику роста сингенной меланомы B16 у мышей C57BL/6 при ортотопической (внутрикожной) и интрамаммарной (в жировую клетчатку молочной железы) трансплантации опухолевого материала, полученного разными методами.

Материалы и методы. Эксперимент проведен на половозрелых мышах-самках линии C57BL/6. Сформировано 6 групп по 8 животных в каждой. Группам 1–3 трансплантировали опухолевый материал меланомы B16 в виде изографтов (50 % суспензия клеток из фрагмента опухоли), группам 4–6 – опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные *in vitro* до раннего (P6) и позднего (P14) пассажей. Перевивку осуществляли внутрикожно или интрамаммарно.

Результаты. Установлено, что метод получения опухолевого материала (изографт или клеточная линия), число пассажей *in vitro* и сайт трансплантации (внутрикожно или интрамаммарно) значимо влияют на фенотипические особенности меланомы B16 после перевивки животным. В результате клональной селекции *in vitro* и *in vivo* наблюдали существенные различия во времени появления измеряемых опухолей, кинетике роста и профиле метастазирования. Интрамаммарная трансплантация опухолей обеспечивала снижение частоты возникновения язв (некрозов опухоли) по сравнению с внутрикожной перевивкой вне зависимости от источника опухолевого материала. В то же время развитие изъязвления опухолей значимо не влияло на продолжительность жизни животных.

Заключение. Результаты проведенного исследования дополняют имеющиеся сведения о том, что клетки сингенной меланомы B16 обладают как наследственными, так и селекционными фенотипическими признаками, которые влияют на их способность к метастазированию. Полученные данные могут быть использованы в рутинной работе центров доклинических исследований при планировании и проведении экспериментальных работ с использованием сингенных моделей опухолей.

Ключевые слова: сингенная опухоль, меланома B16, кинетика роста, метастазирование

Для цитирования: Муразов Я.Г., Агацарская Я.В., Крышень К.Л. Особенности роста меланомы B16 у мышей C57BL/6 при использовании различных методов получения опухолевого материала и мест трансплантации сингенной опухоли. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):28–36. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-28-36>

B16 melanoma growth characteristic in C57BL/6 mice with various methods of obtaining tumor material and syngeneic tumor transplantation sites

Iaroslav G. Murazov, Iana V. Agatsarskaya, Kirill L. Kryshen

RMC “Home of Pharmacy”, 3 Zavodskaya st., Kuzmolovsky settl., Vsevolozhsk district, Leningrad region, 188663, Russia

Contacts: Iaroslav Gennadievich Murazov murazov.yg@doclinika.ru

Background. In non-clinical studies of antitumor agents, the use of various sources of tumor material and transplant sites significantly affects the growth parameters of syngeneic tumors, their invasive potential, and the profile of metastasis.

Aim. To evaluate the growth kinetics of syngeneic melanoma B16 in C57BL/6 mice after orthotopic (intradermally) and intramammary (into the mammary fat pad) transplantation of tumor material obtained by different methods.

Materials and methods. The experiment was carried out on mature C57BL/6 female mice. There were six groups with eight animals each. Groups 1–3 were transplanted with isografts of melanoma B16 (50 % cell suspension from tumor fragments), groups 4–6 were inoculated with cancer cells from primary culture, cultured *in vitro* to the early (P6) and late (P14) passages. Inoculation was performed intradermally or into the mammary fat pad.

Results. It was found that the method of obtaining tumor material (isograft or cell line), the number of *in vitro* passages and the site of transplantation (intradermally or intramammary) significantly affects the phenotypic features of melanoma B16 after inoculation with animals. As a result of clonal selection *in vitro* and *in vivo*, significant differences were observed in the time of appearance of the measured tumors, growth kinetics and metastasis profile. Intramammary tumor transplantation provided a reduction in the incidence of ulcers (tumor necrosis) compared with intradermal transplantation, regardless of the source of tumor material. At the same time, the development of tumor ulceration did not significantly affect the life span of animals.

Conclusion. The results of the study complement the existing data that B16 syngeneic melanoma cells have both hereditary and selective phenotypic characteristics that affect their ability to metastasize. Our data can be used in the routine work of preclinical centers for the purpose of planning and conducting studies using syngeneic tumor models.

Keywords: syngeneic tumor, B16 melanoma, growth kinetics, metastasis

For citation: Murazov Ia.G., Agatsarskaya Ia.V., Kryshen K.L. B16 melanoma growth characteristic in C57BL/6 mice with various methods of obtaining tumor material and syngeneic tumor transplantation sites. Rossiyskiy biotерапевтический журнал = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):28–36 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-28-36>

Введение

Внедрение в клиническую практику ингибиторов контрольных точек иммунитета (иИКТ: анти-PD-1/PD-L1, анти-CTLA-4) для лечения меланомы обеспечило значительное увеличение показателей ответа опухоли и выживаемости пациентов, в том числе с метастатической формой заболевания [1]. В то время как использование ксенотрансплантатов у иммунодефицитных животных является основным подходом в неклинических исследованиях противоопухолевых агентов, развитие иммунотерапии рака вернуло в центр внимания сингенные модели опухолей у иммунокомпетентных животных с интактной иммунной системой [2].

Цель исследования — оценить кинетику роста сингенной меланомы B16 у мышей C57BL/6 при ортотопической (внутрикожной) и интрамаммарной (в жировую клетчатку молочной железы — МЖ) трансплантации опухолевого материала, полученного разными методами.

Материалы и методы

Исследование проведено на половозрелых мышках линии C57BL/6 SPF-категории. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях [3]. В качестве источника

опухолевого материала использовали замороженную в жидком азоте суспензию клеток из фрагмента опухоли меланомы B16 в 0,9 % растворе натрия хлорида с добавлением 10 % диметилсульфоксида. Характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1. Трансплантацию опухолевого материала выполняли ортотопически (внутрикожно) [4] и интрамаммарно (в жировую клетчатку 4-й правой брюшной МЖ) [5].

У животных оценивали следующие показатели: динамику массы тела, степень энgraфтмента (приживления) и сроки появления измеряемых опухолей. Измерение линейных размеров опухоли проводили с помощью цифрового штангенциркуля. Объем опухоли в каждой временной точке определяли по формуле

$$V = (A \times B^2)/2,$$

где V — объем опухоли, мм³; A — наибольший диаметр опухоли, мм; B — перпендикулярный ему диаметр, мм.

Измерение объема опухоли продолжали до тех пор, пока в группе оставалось не менее 3 животных. Оценивали кинетику роста трансплантированных опухолей, частоту изъязвления опухолей, общую выживаемость (ОВ), массовый коэффициент опухоли (МКО) и профиль метастазирования по данным некропсии. Период наблюдения составил 68 дней.

Статистический анализ выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism версии 9.1.1. При множественных

Таблица 1. Характеристика экспериментальных групп

Table 1. Characteristics of experimental groups

Группа Group	N	Источник опухолевого материала Source of tumor material	Сайт трансплантации Site of transplantation	Количество материала на мышь Quantity of material per mouse
1	8♀	<i>In vivo</i> ¹ (внутрикожная опухоль) <i>In vivo</i> ¹ (intra-dermal tumor)	Внутрикожно Intradermally	50 % суспензия в 100 мкл среды DMEM 50 % suspension in 100 µl DMEM medium
2	8♀	<i>In vivo</i> ¹ (внутрикожная опухоль) <i>In vivo</i> ¹ (intra-dermal tumor)	Интрамаммарно Intramammary	
3	8♀	<i>In vivo</i> ¹ (интрамаммарная опухоль) <i>In vivo</i> ¹ (intramammary tumor)	Внутрикожно Intradermally	
4	8♀	Опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные <i>in vitro</i> ² , – P6 Tumor cells from primary culture cultured <i>in vitro</i> ² – P6		
5	8♀	Опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные <i>in vitro</i> ² , – P14 Tumor cells from primary culture cultured <i>in vitro</i> ² – P14		
6	8♀	Опухолевые клетки из первичной культуры, культивированные <i>in vitro</i> ² , – P14 Tumor cells from primary culture cultured <i>in vitro</i> ² – P14	Интрамаммарно Intramammary	2 × 10 ⁶ клеток в 100 мкл среды DMEM 2 × 10 ⁶ cells in 100 µl DMEM medium

¹Для формирования опухолевых изографтов 2 мышам внутрикожно и 1 мышь интрамаммарно перевивали по 2 × 10⁶ клеток в 100 мкл среды DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ООО «БиолоТ», Россия) на мышь, полученных из первичной культуры опухолевых клеток внутрикожной опухоли и культивированных *in vitro* до 2-го пассажа (P2). Через 21 день мышей подвергали этаназии, а из выросших опухолей приготовили суспензии клеток для последующей трансплантации мышам групп 1–3.

²Мышам групп 4–6 трансплантировали клетки линии меланомы B16, полученные из первичной культуры опухолевых клеток, выделенной из внутрикожного изографта, и культивированные *in vitro* по стандартной методике до 6-го (P6, ранний) и 14-го (P14, поздний) пассажей.

¹To form the tumor isografts, two mice were intradermally and one mouse was intramammary transplanted with 2 × 10⁶ cells in 100 µl of DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, "BioloT", LLC, Russia) per mouse, obtained from the primary culture of tumor cells of the intra-dermal tumor and cultured *in vitro* up to the 2nd passage (P2). After 21 days, the mice were euthanized, and a cell suspension was prepared from the grown tumors for subsequent transplantation into mice of groups 1–3.

²Mice of groups 4–6 were transplanted with B16 melanoma cell line obtained from the primary tumor cell culture isolated from the intra-dermal isograft and cultured *in vitro* according to the standard technique up to the 6th (P6, early) and 14th (P14, late) passages.

попарных сравнениях приведено значение скорректированного на множественность сравнения p -значения (p_{adj}). Различия считали статистически значимыми при значениях достигнутого уровня значимости $p < 0,05$.

Результаты

Динамика массы тела животных групп 1–6 представлена на рис. 1. Увеличение массы тела животных групп 1–5 со временем было обусловлено ростом трансплантированных опухолей и формированием опухолей большого объема. В группе 6 изменение массы тела в течение эксперимента было менее выражено по сравнению с другими группами. В группе 4 с трансплантированной клеточной линией меланомы B16 из P6 в начальный период наблюдали снижение массы тела, что, по-видимому, является результатом

ухудшения качества жизни мышей из-за раннего изъязвления опухолей, их некрозов и кровоточивости.

В табл. 2 приведены сведения о степени энграфт-мента, сроках появления измеряемых опухолей и длительности измерения линейных размеров опухоли в эксперименте.

На момент начала измерений имелись статистически значимые различия в объеме опухолей (Welch's ANOVA test, $p = 0,0003$). Post-hoc тест Геймса–Хоуэлла выявил статистически значимые различия между группами 2 и 4 ($p_{adj} = 0,0119$), группами 3 и 6 ($p_{adj} = 0,0080$) и группами 4 и 6 ($p_{adj} = 0,0040$) (рис. 2).

Кинетические кривые роста меланомы B16 приведены на рис. 3. В группах 1 и 3 наблюдали быстрый рост внутрикожных опухолей, полученных после трансплантации суспензии клеток из внутрикожного (группа 1) и интрамаммарного (группа 3) изографтов.

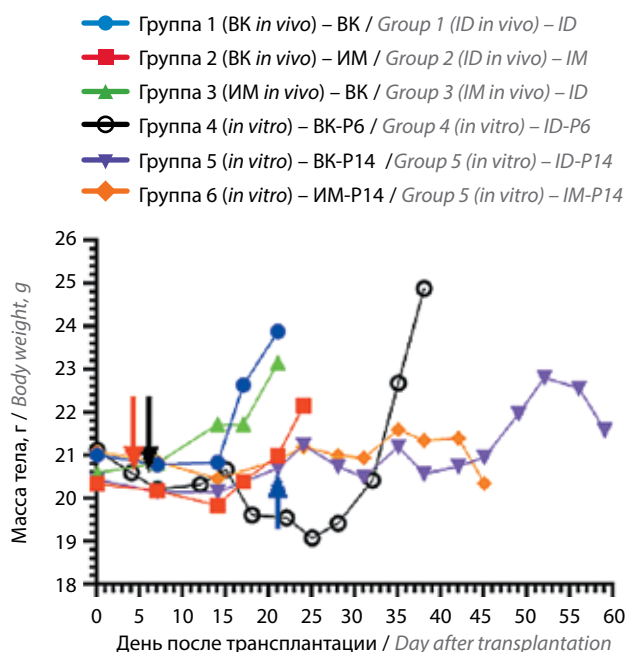


Рис. 1. Динамика массы тела животных экспериментальных групп. Красной стрелкой указан день появления измеряемых опухолей в группах 1–3, черной – в группе 4, синей – в группах 5 и 6. Данные представлены в виде среднего значения (mean). Здесь и на рис. 2–6: BK – внутрикожный, IM – интрамаммарный

Fig. 1. The course of body weight of animals in experimental groups. The red arrow indicates the day of appearance of the measured tumors in groups 1–3, the black arrow is in group 4, and the blue arrow is in groups 5 and 6. Data are presented as a mean value. Here and on fig. 2–6: ID – intradermally, IM – intramammary

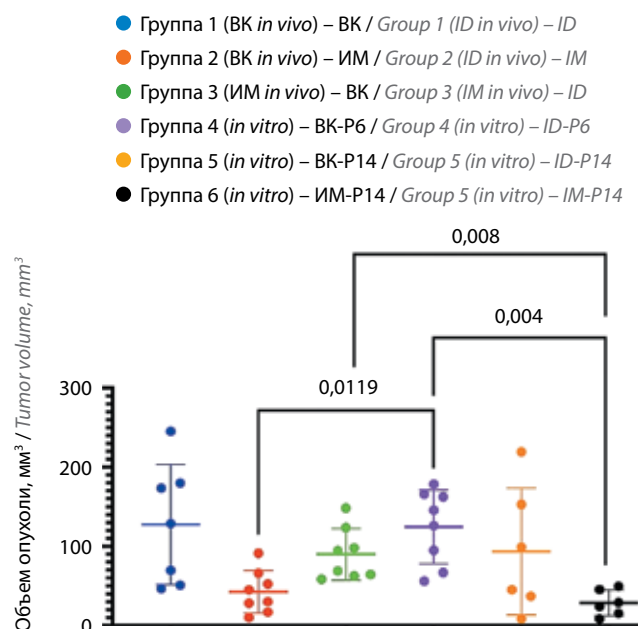


Рис. 2. Объем опухоли на момент начала измерений. Данные представлены в виде среднего (mean) и стандартного отклонений (SD). Указаны все индивидуальные значения

Fig. 2. Tumor volume at the start of measurements. Data are presented as mean deviation and standard deviation (SD). All individual values are indicated

Для опухолей, полученных после трансплантации клеток из P6 и P14 и перевитых внутрикожно, наблюдали сходный профиль кинетических кривых.

Таблица 2. Параметры оценки формирования опухолей меланомы B16 в зависимости от источника опухолевого материала и сайта трансплантации

Table 2. Parameters for assessing the formation of B16 melanoma tumors depending on the source of tumor material and the site of transplantation

Группа Group	Число животных (число эффективных животных) Number of animals (number of effective animals)	Энграфтмент, абс. (%) Engraftment, abs. (%)	День появления измеряемых опухолей* Day of onset of measurable tumors*	День окончания измерений размеров опухоли Last day of tumor measurements*
1	8 (8)	8/8 (100)	4	21
2				24
3				21
4			5	38
5	8 (6)	7/8 (87,5)	24-й – 3♀, 28-й – 3♀, отсроченное появление опухоли на 35-й – 1♀ 24 th – 3♀, 28 th – 3♀, delayed appearance of the tumor on the D35 – 1♀	56
6	8 (6)	7/8 (87,5)	24-й – 6♀, отсроченное появление опухоли на 35-й – 1♀ 24 th – 6♀, delayed appearance of the tumor on the D35 – 1♀	42

*Со дня после трансплантации.

*From the day after transplantation.

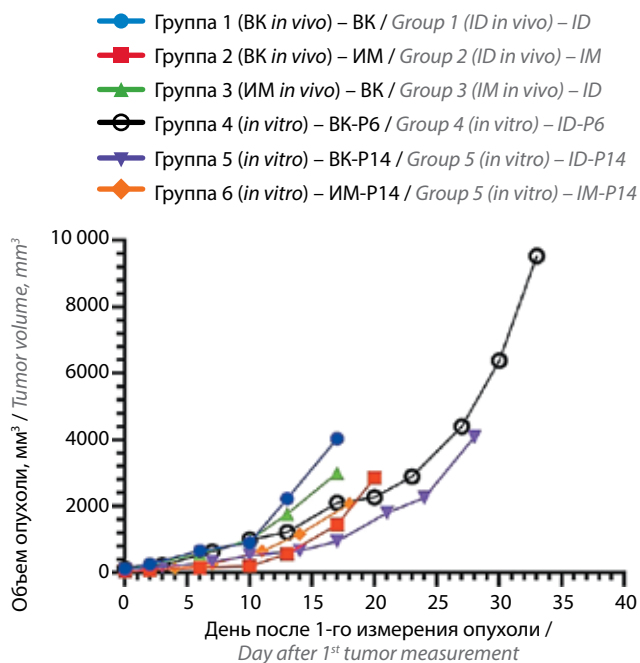


Рис. 3. Кинетика роста опухолей. Данные представлены в виде среднего значения (mean)

Fig. 3. Tumor growth kinetics, all groups. Data are presented as mean

При интрамаммарной трансплантации различного материала кинетические кривые были практически идентичны с той лишь разницей, что средний конечный объем опухоли в группе 2 был больше. Это обусловлено большей продолжительностью жизни мышей в этой группе.

На рис. 4 представлены сведения о частоте изъязвления опухолей у животных групп 1–6. Как видно из рис. 4, в группах с внутрикожной трансплантацией опухоли практически у всех мышей наблюдали изъязвление опухолей, что согласуется с данными литературы [5]. Напротив, в группах с интрамаммарной трансплантацией только у 2 животных группы 6 обнаружили язвы.

На рис. 5 представлены кривые Каплана–Мейера ОВ животных в экспериментальных группах. При попарном сравнении кривых ОВ логранк-тестом статистически значимых различий в ОВ не установлено (при использовании скорректированного с помощью поправки Бонферрони значения $\alpha = 0,0033$). Вероятно, для того чтобы получить статистически значимые различия, необходимо увеличить размер выборки животных в экспериментальных группах.

На рис. 6 приведены данные о МКО у животных групп 1–6. Следует отметить, что измерить массу опухоли в ходе некропсии удалось не у всех животных, т. к. среди мышей наблюдали каннибализм с поеданием опухоли у павших животных внутри одной клетки. Из-за значительной вариабельности МКО внутри групп, а также малого количества животных, у кото-

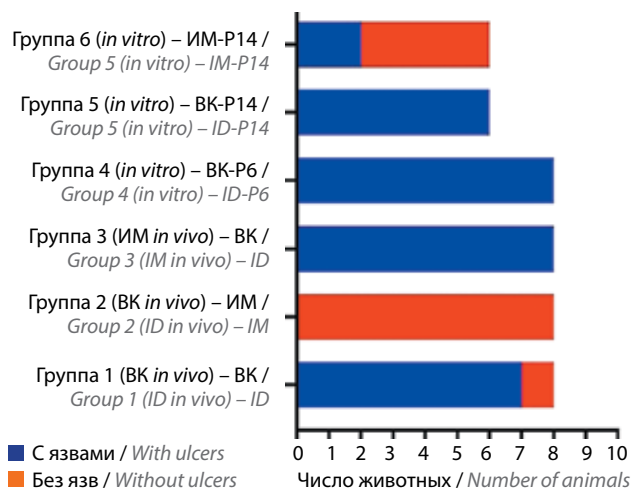


Рис. 4. Частота изъязвления (некроза) экспериментальных опухолей

Fig. 4. Incidence of ulceration (necrosis) of experimental tumors

Медиана общей выживаемости, дни / Median overall survival, days

- 13,5 ● Группа 1 (BK in vivo) – BK / Group 1 (ID in vivo) – ID
- 18,0 ■ Группа 2 (BK in vivo) – ИМ / Group 2 (ID in vivo) – ИМ
- 15,5 ▲ Группа 3 (ИМ in vivo) – BK / Group 3 (ИМ in vivo) – ID
- 21,0 ○ Группа 4 (in vitro) – BK-P6 / Group 4 (in vitro) – ID-P6
- 27,0 ▼ Группа 5 (in vitro) – BK-P14 / Group 5 (in vitro) – ID-P14
- 21,0 ◆ Группа 6 (in vitro) – ИМ-P14 / Group 5 (in vitro) – ИМ-P14

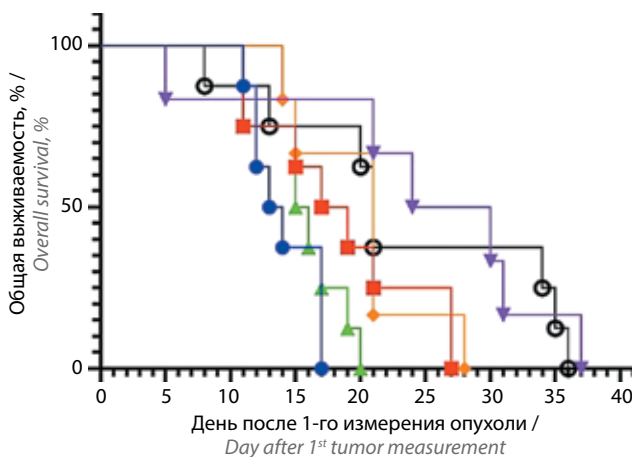


Рис. 5. Кривые Каплана–Мейера общей выживаемости животных в экспериментальных группах

Fig. 5. Kaplan–Meier curves of overall survival of animals in experimental groups

рых удалось оценить МКО, статистически значимые различия для этого показателя не были получены.

В табл. 3 представлены сведения о характере метастатического поражения внутренних органов и тканей животных. В группах 1 и 3 рост опухоли был ограничен только местом инокуляции исходного опухолевого материала, полученного из внутрикожного и интрамаммарного изографтов. В то же время внутрикожный изографт, перевитый интрамаммарно

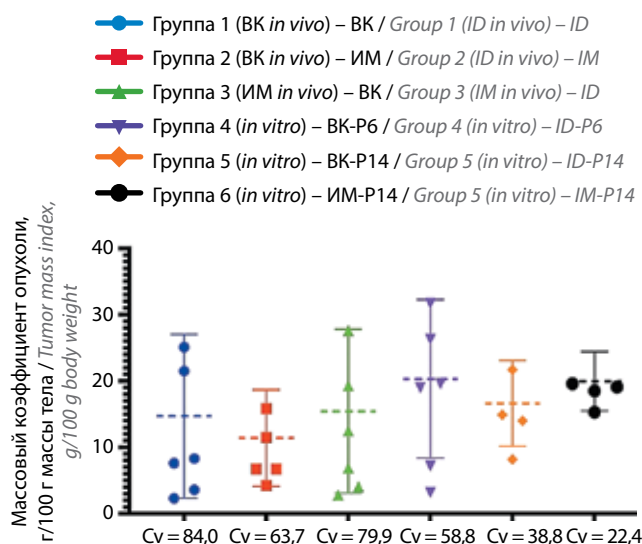


Рис. 6. Массовый коэффициент опухоли. Данные представлены в виде среднего (mean) и стандартного отклонений (SD). Указаны все индивидуальные значения. Cv – коэффициент вариации, %

Fig. 6. Tumor mass index. Data are presented as mean and standard deviation (SD). All individual values are indicated. Cv – coefficient of variation, %

(группа 2), обеспечил формирование широкого спектра метастатического поражения органов грудной и брюшной полостей. Интересно, что в результате клональной селекции отдельных субпопуляций клеток меланомы B16, культивированных *in vitro* до 6-го и 14-го пассажей и впоследствии трансплантированных внутривенно (группы 4 и 5), частота возникновения макроскопических метастазов в легкое достигла 50 %. При этом 1-й случай возникновения метастазов в легкое был зарегистрирован на 21-й день после 1-го измерения опухолей вне зависимости от источника получения опухолевого материала и сайта трансплантации. Во всех случаях наличие метастазов меланомы B16 было подтверждено гистологически. В целом профиль метастазирования

меланомы B16 в исследовании соответствовал такому, характерному для меланомы человека [6].

Важным наблюдением в проведенном исследовании было появление злокачественного геморрагического плеврального выпота. Причем не всегда наличие плеврального выпота сопровождалось макроскопическим выявлением метастазов в легкое. В группах с интрамаммарной трансплантацией частота плеврального выпота достигала 50 % (табл. 4). Следует отметить, что у человека частота злокачественного плеврального выпота при меланоме не превышает 2 % [7].

При цитологическом анализе мазков плеврального выпота, окрашенных по Романовскому, выявлены меланоциты со множественными цитологическими критериями злокачественности, включая варибельную пигментацию, многоядерность, анизоцитоз от умеренного до выраженного и анизокариоз, варибельное ядерно-цитоплазматическое соотношение и формирование ядра. В мазках также определяли большие клетки с обильной пенистой цитоплазмой, содержащей материал, соответствующий пигменту (вероятно, меланофаги) (рис. 7).

Обсуждение

В неклинических исследованиях перспективных противоопухолевых агентов использование различных источников получения опухолевого материала и сайтов трансплантации существенно влияет на параметры роста сингенных опухолей, на их инвазивный потенциал и профиль метастазирования. В настоящее время ведутся широкие дебаты по поводу достоверности результатов, полученных на immortalized коммерческих клеточных линиях опухолей человека и животных, из-за возможности клональной селекции и артефактов, связанных с культивированием *in vitro*. Клеточные линии адаптируются к искусственной среде без стромальных, сосудистых и воспалительных клеток. В последнее

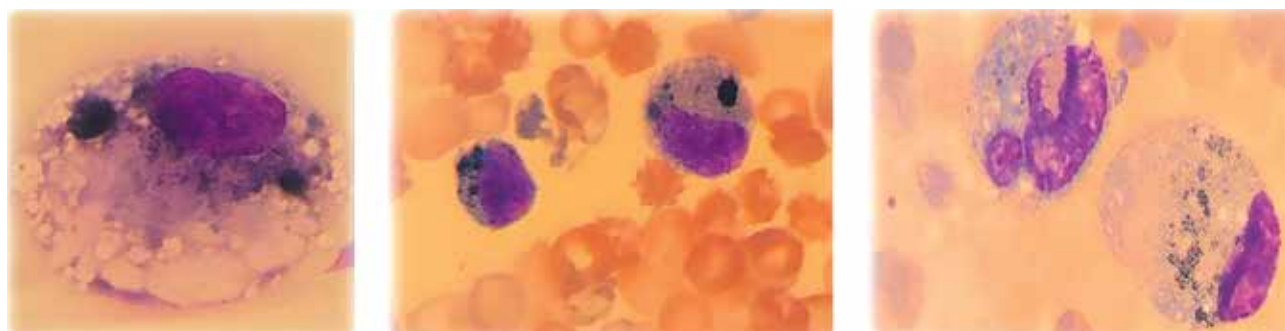


Рис. 7. Цитологическая картина мазков геморрагического плеврального выпота. Цитологическая дифференцировка обнаруженных в мазках клеток затруднена, поскольку пигментированные макрофаги, поглотившие клетки меланомы (меланофаги), имитируют клетки меланомы

Fig. 7. Cytological view of smears of hemorrhagic pleural effusion. There are difficulties with cytological differentiation of cells found in smears as pigmented macrophages that have ingested melanoma cells (melanophages) mimic melanoma cells

Таблица 3. Сведения о частоте и очагах метастазирования экспериментальных опухолей меланомы B16, полученных в эксперименте
Table 3. Details about the incidence and foci of metastasis of experimental B16 melanoma tumors obtained in the experiment

Группа Group	Локализация метастазов Localization of metastases	Частота, абс. (%) Incidence, abs. (%)
1 – (BK <i>in vivo</i>) – BK 1 – (ID <i>in vivo</i>) – ID	Макроскопически метастазы не выявлены ни у одного животного Macroscopically, metastases were not detected in any animal	
2 – (BK <i>in vivo</i>) – ИМ 2 – (ID <i>in vivo</i>) – IM	Метастазы в легкое (макроскопические) Metastases in the lung (macroscopic)	3/8 (37,5)
	Брыжейка кишечника, ворота печени, парагонадная клетчатка Mesentery of the intestine, hilum of the liver, paragonadal fat pad	5/8 (62,5)
	Яичник Ovary	1/8 (12,5)
3 – (ИМ <i>in vivo</i>) – BK 3 – (IM <i>in vivo</i>) – ID	Макроскопически метастазы не выявлены ни у одного животного Macroscopically, metastases were not detected in any animal	
4 – (<i>in vitro</i>) – BK-P6 4 – (<i>in vitro</i>) – ID-P6	Метастазы в легкое (макроскопические) Metastases in the lung (macroscopic)	4/8 (50 %)
	Метастазы в двух аксиллярных лимфоузлах со стороны растущей внутрикожной опухоли Metastases in two ipsilateral axillary lymph nodes from a growing intradermal tumor	1/8 (12,5)
5 – (<i>in vitro</i>) – BK-P14 5 – (<i>in vitro</i>) – ID-P14	Метастазы в легкое (макроскопические) Metastases in the lung (macroscopic)	3/6 (50 %)
6 – (<i>in vitro</i>) – ИМ-P14 6 – (<i>in vitro</i>) – IM-P14	Брыжейка кишечника, ворота печени, парагонадная клетчатка Mesentery of the intestine, hilum of the liver, paragonadal fat pad	1/6 (16,7 %)
	Метастазы в легкое макроскопически не обнаружены, но у 3 из 6 мышей был злокачественный плевральный выпот Lung metastases are not found macroscopically, but 3 out of 6 mice have a malignant pleural effusion	
	Метастазы в паратрахеальные лимфоузлы Metastases in paratracheal lymph nodes	2/6 (33,3)

Примечание. Здесь и в табл. 4: BK – внутрикожный; ИМ – интрамаммарный.
Note. Here and in Table 4: ID – intradermal; IM – intramammary.

Таблица 4. Частота развития злокачественного плеврального выпота
Table 4. Incidence of malignant pleural effusion

Группа Group	Частота, абс. (%) Incidence, abs. (%)
2 – (BK <i>in vivo</i>) – ИМ 2 – (ID <i>in vivo</i>) – IM	4/8 (50)
5 – (<i>in vitro</i>) – BK-P14 5 – (<i>in vitro</i>) – ID-P14	1/6 (17)
6 – (<i>in vitro</i>) – ИМ-P14 6 – (<i>in vitro</i>) – IM-P14	3/6 (50)

время все больший интерес проявляется к технике изографтов, т. е. подход с трансплантацией опухолевого материала в виде фрагментов первичной опухоли или клеточной суспензии из нее от мыши-донора мыши-реципиенту без культивирования *in vitro*. Это

мышинный вариант PDX-моделей (patient-derived xenograft). Техника изографтов сочетает положительные аспекты существующих трансплантируемых моделей *in vivo* – функциональную иммунную систему сингенных моделей, а также консервативные характеристики опухоли и широкое разнообразие PDX-моделей [8]. Ортотопическая трансплантация (т. е. в физиологически релевантную нишу) такого опухолевого материала обеспечивает сходство трансплантируемых моделей с моделями спонтанного канцерогенеза [9]. Ортотопическим сайтом для меланомы является зона дермоэпидермального соединения, поэтому в исследовании была выполнена внутрикожная, а не подкожная трансплантация сингенной опухоли. Многие лаборатории имеют линию и сублинии сингенной меланомы B16. Однако даже в пределах одной лаборатории B16 может быстро меняться с течением времени. Наблюдаемые изменения включают резкие различия в степени пигментации, минимальной канцерогенной дозе, метастатическом потенциале,

экспрессии антигенов и распознавании цитотоксическими Т-лимфоцитами [4]. Известно более 150 клонов и субклонов меланомы B16, которые различаются по инвазивному и метастатическому потенциалам, скорости пролиферации [10]. В представленной работе на конкретном примере продемонстрирована теория клональной эволюции опухоли в результате селекции субпопуляций клеток *in vivo* и *in vitro*, обладающих разным фенотипом. Следует отметить, что в отличие от меланомы человека меланома B16 является иммунологически «холодной» опухолью и плохо поддается лечению ИИКТ [11]. Можно предположить, что клональная архитектура исходной клеточной суспензии меланомы B16, использованной в проведенном исследовании, включала субклон B16F10, который в исходном фрагменте не являлся доминантным. Трансплантация субклона B16F10 моделирует ситуацию у пациентов с меланомой, которые не отвечают на терапию ИИКТ, и может служить для оценки эффективности комбинаций с ИИКТ.

Известно, что по мере внутрикожного роста меланомы B16 наблюдается развитие центрального некроза, изъязвления и кровоточивости опухолевых узлов. Рекомендуется подвергать животных эвтаназии до развития этих явлений [4]. Это существенно сокращает «терапевтическое окно», т.е. максимальное время от начала экспериментальной терапии после рандомизации до окончания исследования. Альтернативным сайтом трансплантации может быть интрамаммарная трансплантация в жировую клетчатку МЖ мышей. С. Obodozie и соавт. в 2019 г. показали, что

в данном случае наблюдается более высокая гомогенность роста опухоли без ее изъязвления, а также высокая инфильтрация опухоли иммунокомпетентными клетками, что важно для выполнения иммуноонкологических экспериментов [5]. В проведенном исследовании отчасти подтвердилось предположение о том, что жировая клетчатка МЖ служит буферной зоной между опухолью и дермой, ограничивая изъязвление опухоли. Феномен высокой частоты метастазирования интрамаммарных опухолей меланомы B16 и развития злокачественного плеврального выпота, по-видимому, обусловлен особенностями кровотока и лимфотока МЖ животных.

Заключение

Результаты проведенного исследования дополняют сведения о том, что клетки сингенной меланомы B16 обладают как наследственными, так и селекционными фенотипическими признаками, которые влияют на их способность к метастазированию. На конкретном примере показано, насколько гетерогенным может быть поведение сингенных опухолей, полученных изначально только из одного фрагмента, в зависимости от вида опухолевого материала (изографт или клеточная линия), условий культивирования (количество пассажей) и сайта трансплантации (внутрикожно или интрамаммарно). Полученные данные могут быть использованы в рутинной работе центров доклинических исследований при планировании и проведении экспериментальных работ с использованием сингенных моделей опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Switzer B., Puzanov I., Skitzki J.J. et al. Managing metastatic melanoma in 2022: A clinical review. *JCO Oncol Pract* 2022;18(5):335–51. DOI: 10.1200/OP.21.00686
- Taylor M.A., Hughes A.M., Walton J. et al. Longitudinal immune characterization of syngeneic tumor models to enable model selection for immune oncology drug discovery. *J Immunother Cancer* 2019;7(1):328. DOI: 10.1186/s40425-019-0794-7
- European Parliament and the Council of the European Union. 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union* 2010;53:33–79.
- Overwijk W.W., Restifo N.P. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol* 2001;Chapter 20:Unit 20.1. DOI: 10.1002/0471142735.im2001s39
- Obodozie C., Ruf S., Bijelic G. et al. Abstract A012: Mammary fat pad injections: An alternative implantation method for syngeneic tumor models. *Mol Cancer Therap* 2019;18(12 Suppl.):A012. DOI: 10.1158/1535-7163.TARG-19-A012
- Belhocine T.Z., Scott A.M., Even-Sapir E. et al. Role of nuclear medicine in the management of cutaneous malignant melanoma. *J Nucl Med* 2006;47(6):957–67. PMID: 16741305
- Chen J.T., Dahmash N.S., Ravin C.E. et al. Metastatic melanoma in the thorax: Report of 130 patients. *AJR Am J Roentgenol* 1981;137(2):293–8. DOI: 10.2214/ajr.137.2.293
- Jantschkeff P., Beshay J., Lemarchand T. et al. Mouse-derived isograft (MDI) *in vivo* tumor models I. spontaneous sMDI models: Characterization and cancer therapeutic approaches. *Cancers (Basel)* 2019;11(2):244. DOI: 10.3390/cancers11020244
- McCauley H.A., Guasch G. Serial orthotopic transplantation of epithelial tumors in single-cell suspension. *Methods Mol Biol* 2013;1035:231–45. DOI: 10.1007/978-1-62703-508-8_20
- Poste G., Doll J., Fidler I.J. Interactions among clonal subpopulations affect stability of the metastatic phenotype in polyclonal populations of B16 melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78(10):6226–30. DOI: 10.1073/pnas.78.10.6226
- Kamensek U., Ursic K., Markelc B. et al. Mutational burden, MHC-I expression and immune infiltration as limiting factors for in situ vaccination by TNF α and IL-12 gene electrotransfer. *Bioelectrochemistry* 2021;140:107831. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2021.107831

Вклад авторов

Я.Г. Муразов: разработка дизайна исследования, проведение эксперимента *in vivo*, анализ результатов исследования, написание текста рукописи;

Я.В. Агацарская: культивирование опухолевых клеток, подготовка клеточного материала для трансплантации животным, анализ результатов исследования, редактирование текста рукописи.

К.Л. Крышень: критические замечания, редактирование текста статьи.

Author's contributions

Ia.G. Murazov: study design development, conducting an *in vivo* experiment, analyzing the results of the study, writing the text of the manuscript; Ia.V. Agatsarskaya: cancer cell culturing, preparation of cellular material for transplantation into animals, analyzing the results of the study, editing the text of the manuscript.

K.L. Kryshen: critical revision of the article, editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Я.Г. Муразов / Ia.G. Murazov: <https://orcid.org/0000-0002-6573-3112>

Я.В. Агацарская / Ia.V. Agatsarskaya: <https://orcid.org/0000-0002-7772-7318>

К.Л. Крышень / K.L. Kryshen: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике АО «НПО «Дом фармации», заключение БЭК № 2.5/23.

Compliance with principles of bioethics. The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of RMC «Home of Pharmacy», ethical approval No 2.5/23.

Статья поступила: 06.09.2023. Принята в печать: 24.11.2023.

Article received: 06.09.2023. Accepted for publication: 24.11.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-37-44>

Влияние инактивирующих гетерозиготных мутаций в генах репарации ДНК на развитие экспериментального канцерогенеза легкого у мышей

М.А. Майдин¹, М.Н. Юрова¹, Е.И. Федорос¹, П.В. Сергиев², С.Н. Алексахина¹, Е.А. Отраднова¹, С.С. Круглов¹, Е.Н. Имянитов¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, ул. Колмогорова, 1

Контакты: Михаил Александрович Майдин mikhail.maydin@gmail.com

Введение. Известно, что инактивирующие мутации в генах *Chek2* и *Gprc5a* ассоциированы с развитием онкологических заболеваний. Экспериментальные исследования канцерогенеза у генетически модифицированных мышей позволяют получить новые данные об их влиянии на развитие патологии.

Цель исследования – на мышах с гетерозиготными инактивирующими мутациями в генах *Chek2* и *Gprc5a* оценить выживаемость, а также множественность и размеры экспериментальных опухолей в модели канцерогенеза легкого.

Материалы и методы. Использовали мышей гибридов 2-го поколения от скрещивания гетерозиготных по исследуемым мутациям самцов СВAB6F1 с самками BALB/c дикого типа: потомков носителей мутаций *Chek2*^{dAA} (76 самцов и 64 самки) и *Gprc5a*^{insA} (60 самцов и 42 самки). Начиная с 4-месячного возраста мыши получали уретан (этилкарбамат) внутривентрально в дозе 600 мг/кг еженедельно в течение 6 нед. После генотипирования с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции животных распределяли по группам. Через 40 нед от начала опыта проводили оценку параметров канцерогенеза.

Результаты. Доля доживших до 3-месячного возраста мышей с мутациями примерно соответствовала менделевскому распределению (35/41 самцы и 33/31 самки) для потомства самцов, гетерозиготных по *Chek2*^{dAA}, и была существенно меньше в случае *Gprc5a*^{insA} (20/40 самцы и 17/25 самки; $p = 0,043$). Гибель носителей *Gprc5a*^{insA} в течение опыта также была выше, чем у контрольной группы ($p = 0,0506$ у самок). У 2 из 4 погибших до окончания опыта самок *Gprc5a*^{insA} обнаружены синхронные новообразования легких и тимуса, не встречавшиеся в других группах. В конце эксперимента не выявлено существенных различий между значениями показателей множественности, средних линейных размеров и объемов опухолей в группах мышей с мутациями и без них.

Заключение. Установлено, что гетерозиготная инактивирующая мутация *Chek2*^{dAA} у мышей не влияет на развитие животных раннего возраста и не модифицирует параметры индуцированного канцерогенеза легкого. Гетерозиготное носительство мутации *Gprc5a*^{insA} у мышей повышает риск ранней гибели и чувствительность к токсическому и канцерогенному воздействию уретана.

Ключевые слова: мыши, канцерогенез, инактивирующие мутации, CHEK2, GPRC5A

Для цитирования: Майдин М.А., Юрова М.Н., Федорос Е.И. и др. Влияние инактивирующих гетерозиготных мутаций в генах репарации ДНК на развитие экспериментального канцерогенеза легкого у мышей. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):37–44. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-37-44>

Effect of inactivating heterozygous mutations in DNA repair genes on experimental lung carcinogenesis in mice

Mikhail A. Maydin¹, Maria N. Yurova¹, Elena I. Fedoros¹, Petr V. Sergiev², Svetlana N. Aleksakhina¹, Ekaterina A. Otradnova¹, Stepan S. Kruglov¹, Evgeny N. Imyanitov¹

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaia Str., Pesochnyi, Saint Petersburg 197758, Russia;

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Kolmogorova Str., Moscow 119991, Russia

Contacts: Mikhail Aleksandrovich Maydin mikhail.maydin@gmail.com

Background. Inactivating mutations in *Chek2* and *Gprc5a* genes are known to be associated with cancer development. Experimental carcinogenesis studies in genetically modified mice generate new data on their influence on pathology development.

Aim. In the present study in a model of lung carcinogenesis, survival parameters as well as tumor multiplicity and size in mice with *Chek2* and *Gprc5a* heterozygous inactivating mutations were evaluated.

Material and methods. F2 hybrid mice from crosses between CBAB6F1 males heterozygous for the studied mutations and wild-type BALB/c females were used: *Chek2*^{ΔAA}-carriers (76 males and 64 females) and *Gprc5a*^{insA}-carriers (60 males and 42 females). Starting at four months of age, mice received urethane (ethyl carbamate) intraperitoneally at a dose of 600 mg/kg weekly for 6 weeks. After genotyping by allele-specific PCR, animals were allocated to groups. Carcinogenesis parameters were evaluated 40 weeks after the beginning of the experiment.

Results. The proportion of mice with mutations surviving to the age of three months roughly followed the Mendelian distribution (35/41 males and 33/31 females) for the offspring of males heterozygous for *Chek2*^{ΔAA} and was significantly lower in the case of *Gprc5a*^{insA} (20/40 males and 17/25 females, $p = 0.043$). The death of *Gprc5a*^{insA} carriers during the experiment was also higher than in the control group ($p = 0.0506$ in females). Synchronous lung and thymus neoplasms were found in 2 out of 4 *Gprc5a*^{insA} females that died before the end of the experiment, which were not found in other groups. At the end of the experiment, no significant differences in tumor multiplicity, mean linear size, and volume were found between the groups of mice with and without mutations.

Conclusion. It was found that heterozygous inactivating mutation *Chek2*^{ΔAA} does not affect early age development and does not modify the parameters of induced lung carcinogenesis in mice. Heterozygous carriage of *Gprc5a*^{insA} mutation in mice increases the risk of early death and sensitivity to the toxic and carcinogenic effects of urethane.

Keywords: mice, carcinogenesis, inactivating mutations, CHEK2, GPRC5A

For citation: Maydin M.A., Yurova M.N., Fedoros E.I. et al. Effect of inactivating heterozygous mutations in DNA repair genes on experimental lung carcinogenesis in mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):37–44. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-37-44>

Введение

Наследственные формы рака могут демонстрировать свойства отдельного биологического подтипа и иметь иной профиль лекарственной чувствительности, что требует особых терапевтического и хирургического подходов к лечению [1]. Большинство генов, связанных с наследуемыми типами рака, относятся к группе так называемых генов сохранения стабильности, или генов-попечителей, контролирующих и реализующих различные механизмы репарации ДНК.

Геномные исследования показали ведущую роль генов репарации ДНК в канцерогенезе, особенно при местно-распространенной и метастатической форме опухолевого процесса [2, 3]. *CHEK2* — ядерная серин/треонин-протеинкиназа — является одним из значимых генов, осуществляющих контроль переключения фаз клеточного цикла, работу сигнальной системы репарации ДНК и регуляции апоптоза. У носителей мутаций повышен риск развития рака молочной железы, простаты и толстой кишки, но риск развития рака легкого несколько снижен [4, 5]. В настоящее время определено не менее 100 мутаций в гене *CHEK2*.

GPRC5A (RAIG1) изначально был открыт как индуцируемый ретиноевой кислотой ген, в большей

степени экспрессирующийся в легких [6]. В нормальных тканях белок GPRC5A имеет мембранную локализацию [7] и играет важную роль в процессах регуляции клеточного цикла, репарации ДНК, апоптоза и пр. Исследования последних лет показали, что нарушения экспрессии *GPRC5A* могут привести к развитию множества различных типов рака у людей, а также к другим заболеваниям [8–10].

Установление роли гетерозиготных инактивирующих мутаций в генах репарации ДНК у человека затрудняется тем, что в исследуемую выборку обычно входит только материал, полученный от онкологических пациентов, т. е. отсутствует «контрольная группа». В соответствии с этим исследования на трансгенных животных представляются актуальными.

Цель исследования — на мышях с гетерозиготными инактивирующими мутациями в генах *Chek2* и *Gprc5a* оценить выживаемость, а также множественность и размеры экспериментальных опухолей в модели канцерогенеза легкого.

Материал и методы

Животные. Трансгенные мыши с гетерозиготными инактивирующими мутациями в генах *Chek2*

или *Gprc5a* были получены с использованием систем CRISPR/Cas9 [11]. С целью направленного разрезания и инактивации генов *Chek2* и *Gprc5a* были созданы компоненты системы CRISPR/Cas9. Последовательность гидовой РНК для инактивации гена *Chek2*: GCATACATCGGGACTTAAAGC, *Gprc5a*: GGGGAGCATCTTTCTTTTGT. Для получения зигот использовали мышей инбредных линий СВА (самок) и С57BL/6 (самцов). Генотипирование полученных мышат проводили в возрасте 2 нед.

Использовали отобранную в пробирки с трикалиевой солью этилендиаминуксусной кислоты кровь (40–50 мкл) из кончика хвоста мыши. ДНК из крови выделяли с использованием набора реактивов Blood genomicPrep Mini Spin Kit (Cytiva, США). Генотипирование потомства проводили с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Праймеры для генотипирования представлены в табл. 1.

Таблица 1. Праймеры для генотипирования потомства мышей с мутациями в генах *Chek2* и *Gprc5a*

Table 1. Primers for genotyping offspring of mice with mutations in *Chek2* and *Gprc5a* genes

Название праймера Primer name	Нуклеотидная последовательность праймера Primer nucleotide sequence
nCHEK2_dAA	TCATACATCGGGACTTAGCC
nGPRC5A_insA	GTGCAGGACTCCAACAAAAG

Для получения следующих поколений использовали половозрелых самцов СВAB6F1–носителей гетерозиготных инактивирующих мутаций в генах *Chek2* (с.1057–1058delAA) и *Gprc5a* (с.190insA). Данные мутации приводят к сдвигу рамки считывания и синтезу укороченного белка. Самцов с мутациями скрещивали с самками BALB/c и потомков С (СВAB6F1) F₁ генотипировали в возрасте 3 мес по ранее описанной процедуре. Далее проводили возвратное скрещивание С (СВAB6F1) F₁ самцов – носителей мутации – с самками BALB/c для получения поколения F₂.

В исследование включено 76 самцов и 64 самки – потенциальных носителей мутации *Chek2*^{ΔAA}, а также 60 самцов и 42 самки – потенциальных носителей мутации *Gprc5a*^{insA}.

Условия содержания. Мыши содержались в пластиковых клетках типа Т2 (Tecniplast, Италия) при световом режиме 12:12, температуре 22 ± 2 °С, относительной влажности 50–70 % и режиме проветривания 15 объемов помещения в час. Животные имели свободный доступ к питьевой воде и гранулированному корму (ООО «Лабораторкорм», Россия).

Вещества/препараты. Для индукции канцерогенеза легкого у мышей использовали уретан (этилкарбамат) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Япония). Канцероген вводили внутривентриально в дозе 600 мг/кг еженедельно в течение 6 нед. В качестве растворителя использовали натрия хлорид 0,9 % (ОАО «Дальхимфарм», Россия).

Экспериментальные процедуры. За 1 нед до начала эксперимента у животных была отобрана кровь для генотипирования, как описано ранее. В возрасте 4 мес животные получали 0,6 г/кг уретана внутривентриально еженедельно в течение 6 нед.

В период введения канцерогена и в последующие 2 нед за животными наблюдали ежедневно с целью выявления ослабленных животных, отвечающих критериям эвтаназии, которая осуществлялась ингаляцией CO₂. Животных взвешивали еженедельно в период введения канцерогена (0–6-я недели опыта), далее – 2 раза в месяц. Через 40 нед после начала введения канцерогена эксперимент был остановлен, все мыши были подвергнуты эвтаназии и немедленной аутопсии.

Легкие с опухолями и основные органы фиксировали в 10 % нейтральном формалине (ООО «ЭргоПродакшн», Россия) в течение 24–48 ч. После фиксации оценивали частоту и множественность опухолей легкого на основе макроскопического анализа.

Размер опухолей определяли с помощью штангенциркуля после разделения фиксированных легких на доли. Объем опухолей рассчитывали по формуле объема сфероиды (для опухолей, имеющих форму, близкую к сферической) или эллипсоида (для новообразований, у которых измерялся больший и меньший линейные размеры).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, Inc., США). Количественные данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, а m – ошибка среднего. Для проверки гипотезы о нормальности распределения применяли критерий Шапиро–Уилка. Оценку различий в группах по количественным переменным проводили с использованием многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, критерий Краскела–Уоллиса). Частотные показатели оценивали с использованием двустороннего точного теста Фишера, кривые выживаемости анализировали с использованием критерия Гехана–Уилкоксона. Оценка относительного риска представлена в виде ОР [верхняя граница доверительного интервала; нижняя граница доверительного интервала]. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты генотипирования для мышей – потомков гетерозиготных самцов, несущих мутацию в генах *Chek2* или *Gprc5a*, представлены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты генотипирования мышей в опыте

Table 2. Mice genotyping results

Мутация Mutation	Самцы Males		Самки Females		Всего Total	
	mut	wt	mut	wt	mut	wt
<i>Chek2</i>	35	41	33	31	68	72
<i>Gprc5a</i>	20	40	17	25	37*	65

* $p = 0,043$ по сравнению с ожидаемым распределением, точный тест Фишера.

* $p = 0.043$ compared to the expected distribution, Fisher's exact test.

Как видно из представленных данных, доля мышей – носителей мутации в гене *Chek2*, полученных от скрещивания гетерозиготных самцов с мутацией с самками дикого типа, примерно соответствовала ожидаемой (50/50 %). В то же время гетерозиготное носительство мутации в гене *Gprc5a* сопровождалось более низкой выживаемостью мышей на ранних стадиях развития: до возраста 3 мес (время генотипирования) дожило на 50 % меньше самцов – носителей мутации, чем самцов дикого типа; для самок эти различия составили 32 %. Относительный риск (ОР) гибели в раннем возрасте для самцов – носителей *Gprc5a^{insA}* составил 1,33 [ДИ 1,002; 1,778] и для самок 1,19 [ДИ 0,8151; 1,227].

Динамика гибели экспериментальных животных в ходе исследования представлена на рис. 1.

Мутация в гене *Chek2* не оказывала влияния на выживаемость экспериментальных животных в период и после введения уретана (рис. 1, а).

На 17–19-й дни опыта погибло по одному самцу и одной самке в каждой группе животных (*Chek2* и дикого типа). У самцов – носителей мутации *Chek2^{dAA}*

дополнительно фиксировали случаи ранней гибели животных без опухолей на 81-й и 117-й дни опыта, вероятно, связанные с отсроченной реакцией на токсическое воздействие уретана. У мышей самок дикого типа, погибших на 199-й и 271-й дни опыта, а также у самки с мутацией *Chek2^{dAA}*, погибшей на 250-й день опыта, фиксировали опухоли в легких.

У носителей мутации *Gprc5a^{insA}* (рис. 1, б) наблюдалась повышенная гибель по сравнению с животными без мутации, приближающаяся к уровню статистической значимости у самок ($p = 0,0506$, тест Гехана–Уилкоксона).

Число гибели в течение опыта у носителей гетерозиготной мутации *Gprc5a^{insA}* составило 20 % (4 из 20) у самцов и 23,5 % (4 из 19) – у самок (различия с диким типом не достигают уровня статистической значимости; $p = 0,06$, точный критерий Фишера).

Следует отметить, что у самок – носителей мутации *Gprc5a^{insA}* наблюдали раннюю гибель животных с новообразованиями: на 190-й день от введения канцерогена (2 особи, 1 – с синхронным новообразованием тимуса), на 216-й и 251-й (с синхронным

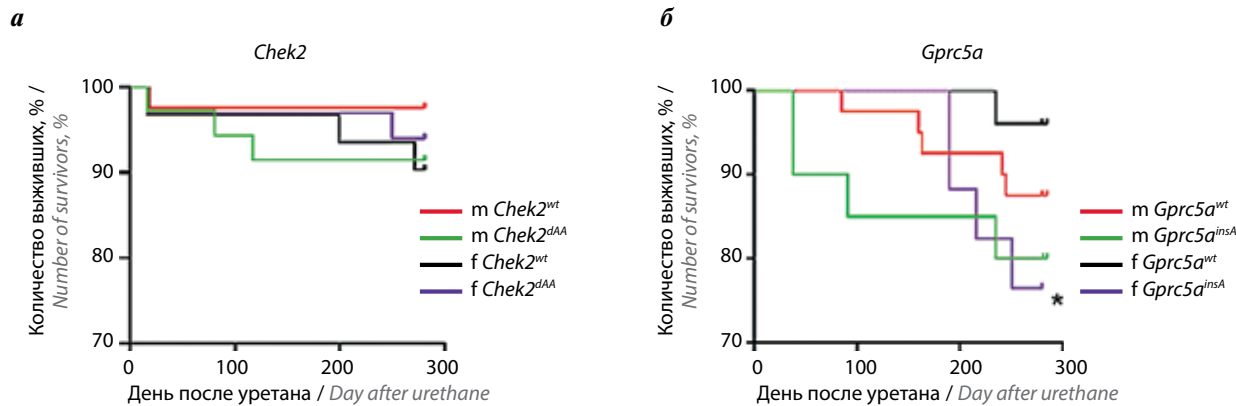


Рис. 1. Динамика гибели экспериментальных животных

*У носителей мутации *Gprc5a^{insA}* наблюдалась повышенная гибель по сравнению с животными без мутации, приближающаяся к уровню статистической значимости у самок: $p = 0,0506$, критерий Гехана–Уилкоксона ($p = 0,0506$)

Fig. 1. Animal survival dynamics

**Gprc5a^{insA}* carriers showed increased mortality compared to non-carriers, approaching the level of statistical significance in females $p = 0.0506$, Gehan–Wilcoxon test ($p = 0.0506$)

новообразованием тимуса) дни опыта (данные не включены в расчет множественности, размеров и объема опухолей). В контрольной группе самок наблюдали гибель животного с новообразованием на 235-й день опыта.

Гибель самцов *Gprc5a^{insA}*, которая наблюдалась в период введения уретана (38-й день, 2 особи) и через 1,5 мес после окончания введения (91-й день, 1 особь), вероятно, была связана с токсическим, а не канцерогенным действием уретана. У животного, погибшего на 235-й день опыта, обнаружены опухолевые новообразования в легких. Среди однопометников без мутации отмечен единичный случай гибели на раннем сроке опыта (85-й день). У 2 из 4 животных, погибших в срок со 160-го по 241-й день опыта, наблюдали новообразования легких на аутопсии.

Под влиянием многократного введения уретана опухоли развивались у 100 % животных, доживших до конца опыта. Множественность опухолей составила $10,5 \pm 1,2$ у самцов – носителей мутации *Chek2^{dAA}* и $9,3 \pm 0,8$ у их однопометников, свободных от мутации ($p > 0,05$). У самок эти значения были схожими ($10,3 \pm 1,1$ и $10,0 \pm 0,9$ соответственно) и также не различались в 2 группах (рис. 2, а). Выявлено, что средний линейный размер опухолей у самцов – носителей мутации *Chek2^{dAA}* статистически значимо превышал значения показателя у самок с таким же генетическим статусом ($1,44 \pm 0,06$ мм vs $1,07 \pm 0,03$ мм; $p < 0,0001$, критерий Краскела–Уоллиса) (рис. 2, в). Аналогичные результаты получены для среднего объема опухоли (рис. 2, д), который составил у носителей гетерозиготной мутации в гене *Chek2* $1,98 \pm 0,27$ мм³ у самцов и $0,83 \pm 0,13$ мм³ – у самок ($p < 0,0001$, критерий Краскела–Уоллиса). Не обнаружено статистически значимых различий в значениях показателей среднего размера и среднего объема опухолей легкого у животных с различным генетическим статусом.

У мышей – носителей инактивирующей мутации в гене *Gprc5a* множественность опухолей составила $10,2 \pm 1,3$ у самцов и $10,2 \pm 1,3$ у самок, что было сравнимо со значениями, полученными у животных без мутации ($12,9 \pm 0,8$ и $13,2 \pm 1,2$ у самцов и самок соответственно; $p > 0,05$) (рис. 2, б). Различия в среднем размере и объеме опухоли между самцами и самками с мутацией, характерные для мышей с *Chek2^{dAA}*, были менее выражены у *Gprc5a^{insA}*. Так, у самцов – носителей мутации *Gprc5a^{insA}* средний размер опухоли составлял $1,33 \pm 0,07$ мм и у самок – $1,16 \pm 0,05$ мм (рис. 2, в), а для среднего объема опухоли были получены значения $1,98 \pm 0,30$ и $1,33 \pm 0,25$ мм³ у самцов и самок соответственно (рис. 2, д). Опухоли у животных – носителей мутации *Gprc5a^{insA}* не отличались по размеру и объему от новообразований у мышей без мутации.

Обсуждение

Проведенное нами исследование показало, что ранняя гибель мышей с гетерозиготной мутацией в гене *Chek2* не отличалась от таковой у мышей дикого типа, что хорошо согласуется с литературными данными, описывающими линию *Chek2^{1100delC}* и нокаутную линию *Chek2^{-/-}* [12].

В наших исследованиях получены данные о том, что носительство гетерозиготной инактивирующей мутации *Gprc5a^{insA}* у мышей сопряжено с повышенным риском гибели в раннем возрасте. В то же время в работе [13] показано, что рождение потомков различного генетического статуса от скрещивания гетерозиготных *Gprc5a^{+/-}* подчиняется менделевскому распределению. Авторы также не наблюдали ускоренной гибели нокаутных или гетерозиготных мышей. Мыши аналогичной нокаутной линии характеризовались ненарушенной структурой легочной ткани и сохраняли нормальное состояние здоровья и продолжительности жизни [14]. Возможно, наличие белка Gprc5a с нарушенной функциональностью в случае инактивирующей мутации *Gprc5a^{insA}* затрудняет реализацию альтернативных механизмов, как это происходит в случае его отсутствия.

В проведенном нами эксперименте при многократном введении уретана частота развития опухолей у мышей самцов и самок составила 100 %, что соответствует более ранним данным по аналогичной модели [15]. При этом существенных различий между значениями показателей множественности, средних линейных размеров и объемов опухолей в группах мышей с мутациями и без таковых не обнаружено. Известно, что гетерозиготные варианты мутаций или нокаутов гена *Chek2* у мышей в отличие от гомозиготных не оказывают существенного влияния на спонтанный и индуцированный канцерогенез у мышей [12, 16]. Это свидетельствует о том, что активность киназы Chek2 избыточна и для нормального функционирования процесса репарации ДНК достаточно 1 копии соответствующего гена. Заслуживает внимания также предположение о возможной компенсации недостаточной активности СНЕК1, близкой по функциям СНЕК2 [17]. Например, на эмбриональных фибробластах, полученных от мышей с двойным нокаутом *Chk1^{+/-}Chk2^{+/-}* в отличие от *Chk1^{+/-}* или *Chk2^{+/-}*, был показан высокий уровень спонтанных повреждений ДНК, совмещенный с недостаточной их репарацией, что может рассматриваться как предиктор канцерогенеза [18].

Проведенное исследование показало, что у мышей с гетерозиготной мутацией *Gprc5a* развивается такое же количество опухолей, как и у животных без мутаций. По данным Q. Тао с соавт. [13], склонностью к повышенному канцерогенезу легких обладают гомозиготные *Gprc5a^{-/-}* животные, но не гетерозиготы.

В работе J. Wang и соавт. 2016 г. показано, что нокаутирование *Gprc5a* увеличивает индуцированную ионизирующим излучением, а также спонтанную частоту опухолей легких у мышей *Gprc5a*^{-/-} [19]; сходные данные были получены в 2020 г. у нокаутных по *Gprc5a*

мышей на модели канцерогенеза легких, индуцированного никотиновым нитрозамин-кетонном [20].

Кроме того, в исследованиях показано, что удаление гена *Gprc5a* у мышей приводит к изменениям регуляции транскрипционного фактора NF-κB, что

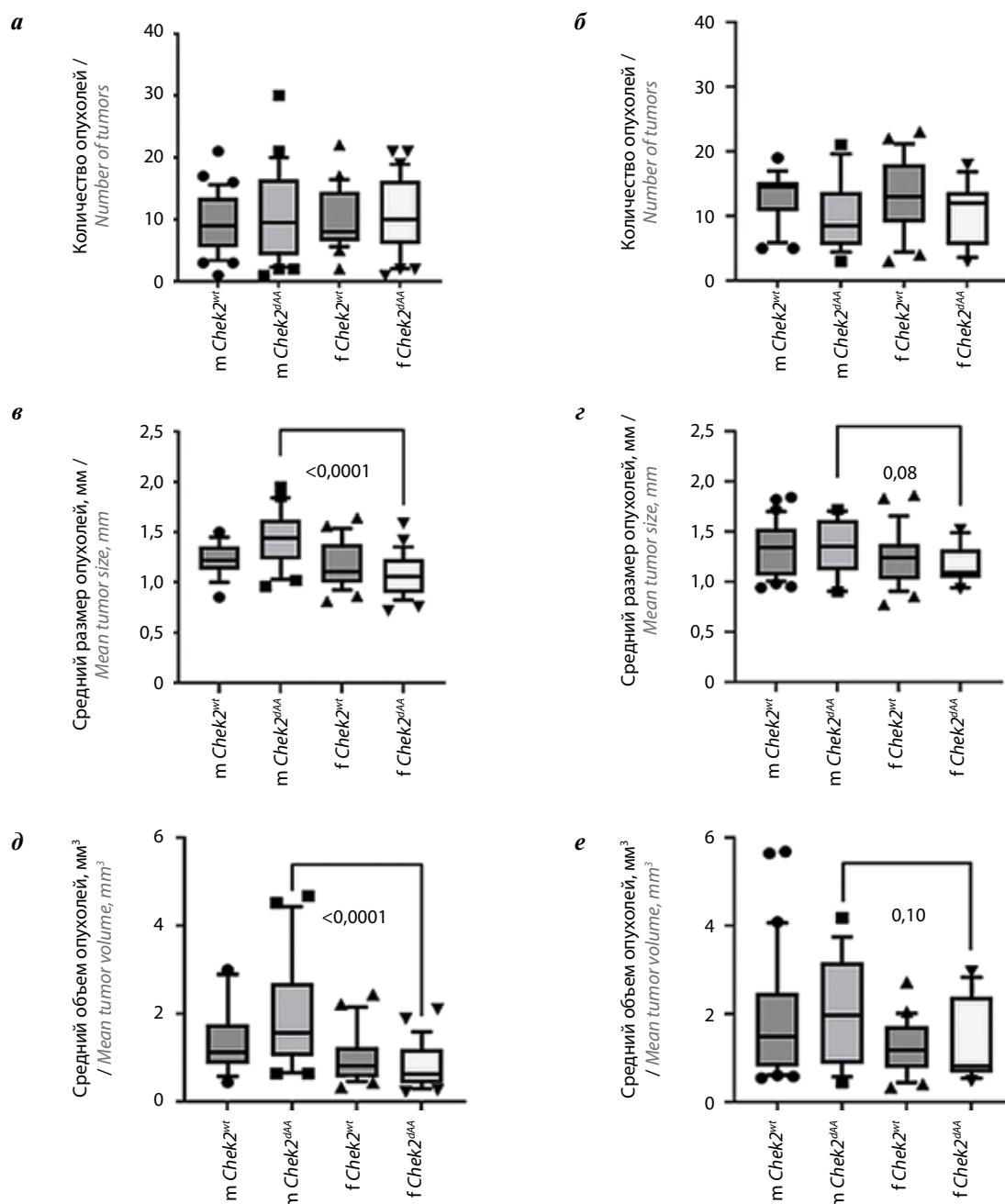


Рис. 2. Множественность и размеры новообразований легких у мышей. Границы «коробки» представляют 1-й и 3-й квартили, линия внутри — медиану, «усы» — 10-й и 90-й процентиля. Использовали критерий Краскела—Уоллиса. Количество новообразований (а и б), средний размер опухолей (мм, в и г) и средний объем новообразований (мм³, д и е) в легких животных групп Chek2 и *Gprc5a* соответственно

Fig. 2. Multiplicity and size of lung neoplasms in mice. The boundaries of the “box” represent the 1st and 3rd quartiles, the line inside represents the median, and the “whiskers” represent the 10th and 90th percentiles. The Kruskal–Wallis criterion was used. Number of neoplasms (a and б), mean tumor size (mm, в and г) and mean volume of neoplasms (mm³, д and е) in the lungs of animals of Chek2 and *Gprc5a* groups, respectively

является причиной нарушений работы иммунной системы: так, мыши *Gprc5a*^{-/-} проявляют более сильные воспалительные реакции в ответ на стимуляцию липополисахаридом и бóльшую склонность к развитию как опухолей легких, так и ассоциированных с ними пневмоний [21, 22].

Возможно, именно особенностями иммунитета гетерозиготных по *Gprc5a* животных можно объяснить наблюдаемую в нашем эксперименте гибель наиболее слабых животных на ранних и средних сроках исследования, которая могла занизить результаты оценки количества и размеров опухолей у мышей данной линии. Ранее нами обнаруживалась тенденция к промотированию опухолей легкого у животных с гетерозиготной мутацией *Gprc5a* [11]. В проведенном эксперименте мы наблюдали синхронные новообразования легкого

и тимуса у 2 не доживших до конца опыта самок мышей *Gprc5a*^{insA} (из 17 включенных), что указывает на повышенную чувствительность мышей с данной мутацией не только к токсическому, но и канцерогенному воздействию уретана.

Заключение

Установлено, что гетерозиготная инактивирующая мутация *Chek2*^{ΔA} у мышей не влияет на развитие животных раннего возраста и не модифицирует параметры индуцированного канцерогенеза легкого. Гетерозиготное носительство мутации *Gprc5a*^{insA} у мышей повышает риск ранней гибели и чувствительность к токсическому и канцерогенному воздействию уретана.

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

1. Imyanitov E.N., Byrski T. Systemic treatment for hereditary cancers: A 2012 update. *Hered Cancer Clin Pract* 2013;11(1):2. DOI: 10.1186/1897-4287-11-2
2. De Castro D.G., Clarke P.A., Al-Lazikani B., Workman P. Personalized cancer medicine: Molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. *Clin Pharmacol Ther* 2013;93(3):252–9. DOI: 10.1038/clpt.2012.237
3. Pritchard C.C., Mateo J., Walsh M.F. et al. Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2016;375(5):443–53. DOI: 10.1056/NEJMOA1603144
4. Cybulski C., Górski B., Huzarski T. et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2004;75(6):1131–5. DOI: 10.1086/426403
5. Kilpivaara O., Vaheristo P., Falck J. et al. CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. *Int J Cancer* 2004;111(4):543–7. DOI: 10.1002/IJC.20299
6. Cheng Y., Lotan R. Molecular cloning and characterization of a novel retinoic acid-inducible gene that encodes a putative G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1998;273(52):35008–15. DOI: 10.1074/JBC.273.52.35008
7. Zhou H., Rigoutsos I. The emerging roles of GPRC5A in diseases. *Oncoscience* 2014;1(12):765–76. DOI: 10.18632/oncoscience.104
8. Kume H., Muraoka S., Kuga T. et al. Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring (SRM) and tissue microarray (TMA) analysis. *Mol Cell Proteomics* 2014;13(6):1471–84. DOI: 10.1074/mcp.M113.037093
9. Liu S., Zhong S., Ye D. et al. Repression of G protein-coupled receptor family C group 5 member A is associated with pathologic differentiation grade of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2013;42(10):761–8. DOI: 10.1111/jop.12077
10. Subrungruang I., Thawornkuno C., Porntip C.P. et al. Gene expression profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2013;14(1):557–63. DOI: 10.7314/APJCP.2013.14.1.557
11. Imyanitov E., Panchenko A., Permyakov O. et al. 21P Urethane-induced lung carcinogenesis in genetically edited C57Bl/6 mice with CHEK2 and GPRC5A heterozygous inactivating mutations. *Ann Oncol* 2020;31:S251. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.173
12. Bahassi E.M., Robbins S.B., Moying Y. et al. Mice with the CHEK2*1100delC SNP are predisposed to cancer with a strong gender bias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(40):17111–6. DOI: 10.1073/PNAS.0909237106
13. Tao Q., Fujimoto J., Men T. et al. Identification of the retinoic acid-inducible *Gprc5a* as a new lung tumor suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(22):1668–82. DOI: 10.1093/jnci/djm208
14. Xu J., Tian J., Shapiro S.D. Normal lung development in RAIG1-deficient mice despite unique lung epithelium-specific expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32(5):381–7. DOI: 10.1165/RCMB.2004-0343OC
15. Панченко А.В., Пигарев С.Е., Федорос Е.И. и др. Трансгенерационный канцерогенез, индуцированный уретаном, у потомков мышей-самцов BALB/c, подвергнутых общему равномерному гамма-облучению. *Вопросы онкологии* 2023;69(2):246–52. DOI: 10.37469/0507-3758-2023-69-2-246-252
16. Panchenko A.V., Pigarev S.E., Fedoros E.I. et al. Urethane-induced transgenerational carcinogenesis in the offspring of male BALB/c mice exposed to general uniform gamma irradiation. *Voprosy onkologii = Oncology issues* 2023;69(2):246–52. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2023-69-2-246-252
17. Takai H., Naka K., Okada Y. et al. Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *EMBO J* 2002;21(19):5195. DOI: 10.1093/EMBOJ/CDF506
18. Stolarova L., Kleiblova P., Janatova M. et al. *CHEK2* germline variants in cancer predisposition: Stalemate rather than checkmate. *Cells* 2020;9(12):2675. DOI: 10.3390/CELLS9122675
19. Niida H., Murata K., Shimada M. et al. Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumour susceptibility *in vivo*. *EMBO J* 2010;29(20):3558. DOI: 10.1038/EMBOJ.2010.218
20. Wang J., Farris A.B., Xu K. et al. GPRC5A suppresses protein synthesis at the endoplasmic reticulum to prevent

- radiation-induced lung tumorigenesis. *Nat Commun* 2016;7:11795. DOI: 10.1038/ncomms11795
20. Fujimoto J., Nunomura-Nakamura S., Liu Y. et al. Development of Kras mutant lung adenocarcinoma in mice with knockout of the airway lineage-specific gene *Gprc5a*. *Int J Cancer* 2017;141(8):1589–99. DOI: 10.1002/ijc.30851
 21. Deng J., Fujimoto J., Ye X.F. et al. Knockout of the tumor suppressor gene *Gprc5a* in mice leads to NF-kappa B activation in airway epithelium and promotes lung inflammation and tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010;3(4):424–37. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0032
 22. Wang T., Jing B., Xu D. et al. PTGES/PGE₂ signaling links immunosuppression and lung metastasis in *Gprc5a*-knockout mouse model. *Oncogene* 2020;39(15):3179–94. DOI: 10.1038/s41388-020-1207-6

Вклад авторов

М.А. Майдин: проведение эксперимента на животных, написание статьи;
 М.Н. Юрова: статистическая обработка данных, написание статьи;
 Е.И. Федорос: редактирование рукописи, подготовка иллюстративного материала;
 П.В. Сергиев: получение исходной трансгенной линии мышей;
 С.Н. Алексахина: написание статьи;
 Е.А. Отраднава: генотипирование потомства;
 С.С. Круглов: разведение животных, подготовка материала для генотипирования;
 Е.Н. Имянитов: концепция исследования, редактирование статьи

Authors contributions

M.A. Maydin: conducting an experiment on animals, article writing;
 M.N. Yurova: statistical processing of data, article writing;
 E.I. Fedoros: manuscript editing, illustrative material preparation;
 P.V. Sergiev: initial transgenic strain generation;
 S.N. Aleksakhina: article writing;
 E.A. Otradnova: genotyping;
 S.S. Kruglov: breeding, blood sampling for genotyping;
 E.N. Imyaninov: research concept, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.А. Майдин / M.A. Maydin: <https://orcid.org/0000-0002-2264-4857>
 М.Н. Юрова / M.N. Yurova: <https://orcid.org/0000-0003-3589-5871>
 Е.И. Федорос / E.I. Fedoros: <https://orcid.org/0000-0002-2426-9843>
 П.В. Сергиев / P.V. Sergiev: <https://orcid.org/0000-0001-8866-1863>
 С.Н. Алексахина / S.N. Aleksakhina: <https://orcid.org/0000-0002-2149-7728>
 Е.А. Отраднава / E.A. Otradnova: <https://orcid.org/0009-0003-0158-1820>
 С.С. Круглов / S.S. Kruglov: <https://orcid.org/0000-0003-1214-4637>
 Е.Н. Имянитов / E.N. Imyaninov: <https://orcid.org/0000-0003-4529-7891>

Соблюдение правил биоэтики. Этические принципы обращения с лабораторными животными соблюдались в соответствии с требованиями документа «Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. СЕД 123». Протокол исследования был рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» (протокол № 1249 от 10.11.2020).

Statement of the welfare of animals. Ethical principles for the handling of laboratory animals were followed in accordance with the requirements of the document “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. ETS No 123”. The study protocol was reviewed and approved by the local ethical committee of the N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (protocol No 1249, 10.11.2020).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 22-25-00569).

Funding. The research was supported by Russian Scientific Fund (project No 22-25-00569).

Статья поступила: 04.09.2023. Принята в печать: 15.11.2023.

Article received: 04.09.2023. Accepted for publication: 15.11.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-45-50>

Ингибирующий эффект ломустина на рост спонтанных HER2-позитивных опухолей молочной железы у трансгенных мышей

В.А. Александров, А.Н. Стуков, Ю.Г. Змитриченко, О.А. Беляева, Г.В. Точильников

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

Контакты: Валерий Анатольевич Александров alexandrov.valeri@yandex.ru

Введение. У больных HER2-положительным раком молочной железы (HER2⁺ РМЖ) в результате таргетной анти-HER2-терапии значительно удлиняется период ремиссии. Однако часто развивается резистентность к терапии. В поисках эффективных дополнительных препаратов при комбинированной терапии целесообразно изучить противоопухолевое действие ломустина (CCNU) при HER2⁺ РМЖ. Ломустин не является таргетным препаратом, но используется для лечения метастазов в головной мозг, поскольку известен как одно из стандартных средств для терапии глиобластом.

Цель исследования – оценить ингибирующую активность ломустина на рост спонтанного HER2⁺ РМЖ у самок мышей FVB/N.

Материалы и методы. Использовали трансгенных мышей HER2⁺ линии FVB/N – самок в возрасте 5–6 мес, из которых отобрали 7 пар животных (для контроля и лечения ломустином) с одинаковыми по размеру спонтанными опухолями молочных желез в каждой паре. Ломустин вводили однократно в дозе 50 мг/кг (перорально через зонд) с последующим 30-дневным наблюдением. Критериями оценки противоопухолевого эффекта были ТРО % (торможение роста опухолей), а также ИРО (индекс роста опухоли), рассчитываемый по отношению площади (S) под кинетической кривой роста опухолей в группе животных с лечением ломустином (S_2) к контролю (S_1). При таком сравнении в контроле ИРО всегда будет 100 %.

Результаты. За период наблюдения объем опухолей молочной железы в контроле (введение растворителя) увеличился в 8 раз, тогда как у мышей, получавших ломустин, опухоли значительно регрессировали. ТРО после лечения ломустином составило 78–92 % ($p = 0,007–0,0006$ к контролю). Суммарное среднее значение S достоверно различалось в 5,6 раза при сравнении двух групп, а ИРО у мышей в группе ломустина составил 18,8 %, тогда как в контроле 100 %; $p = 0,0006$).

Заключение. Ломустин проявляет выраженный ингибирующий эффект на рост спонтанного HER2⁺ РМЖ у трансгенных мышей FVB/N. Результаты свидетельствуют о целесообразности применения ломустина у больных с HER2⁺ РМЖ, осложненным церебральными метастазами.

Ключевые слова: ломустин, HER2, трансгенные мыши, рак молочной железы, противоопухолевый эффект

Для цитирования: Александров В.А., Стуков А.Н., Змитриченко Ю.Г. и др. Ингибирующий эффект ломустина на рост спонтанных HER2-позитивных опухолей молочной железы у трансгенных мышей. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):45–50. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-45-50>

Inhibitory effect of lomustine on the growth of spontaneous HER2-positive mammary tumors in transgenic mice

Valerii A. Alexandrov, Alexander N. Stukov, Yuliya G. Zmitrichenko, Olesya A. Belyaeva, Grigory V. Tochilnikov

N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradskaia Str., Pesochnyi, Saint Petersburg 197758, Russia

Contacts: Valerii Anatolievich Alexandrov alexandrov.valeri@yandex.ru

Background. In patients with HER2-positive breast cancer (HER2⁺ BC), as a result of targeted anti-HER2 therapy, the remission period is significantly prolonged. However, resistance to therapy often develops, especially in relation

to brain metastases. In the search for effective additional drugs in combination therapy, it is advisable to study the antitumor effect of lomustine (CCNU) in HER2⁺ BC. Lomustine is not targeted, but is used to treat brain metastases, because it is known as one of the standard remedies for glioblastomas.

Aim. Evaluate the inhibitory activity of lomustine on the growth of spontaneous HER2⁺ BC in female FVB/N mice.

Materials and methods. Transgenic mice HER2⁺ aged 5–6 months were used, from which seven pairs of animals were selected (for control and treatment with lomustine) with spontaneous mammary tumors of the same size in each pair. Lomustine was administered once at a dose of 50 mg/kg (orally by gavage) followed by a 30-day follow-up. The criteria for evaluating the antitumor effect were ITG % (inhibition of tumor growth), as well as TGI (tumor growth index), calculated by the ratio of the area (S) under the kinetic curve of tumor growth in the group of animals treated with lomustine (S_e) to control (S_c). With such a comparison in the control, TGI will always be 100 %.

Results. During the observation period, the volume of BC in the control (solvent administration) increased 8-fold, while in mice treated with lomustine, the tumors regressed significantly. ITG after treatment with lomustine was 78–92 % ($p = 0.007–0.0006$, to control). The total mean S significantly differed by 5.6 times when comparing the control and lomustine groups and TGI in mice in the lomustine group was 18.8 %, while in the control it was 100 % ($p = 0.0006$).

Conclusion. Lomustine exhibits a pronounced inhibitory effect on the growth of spontaneous HER2⁺ BC in FVB/N transgenic mice. The results indicate the advisability of using lomustine in patients with HER2⁺ BC complicated by cerebral metastases.

Keywords: lomustine, HER2, transgenic mice, breast cancer, antitumor effect

For citation: Alexandrov V.A., Stukov A.N., Zmitrichenko Yu.G. et al. Inhibitory effect of lomustine on the growth of spontaneous HER2-positive mammary tumors in transgenic mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):45–50. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-45-50>

Введение

Гиперэкспрессия HER2 (рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа, кодируемого геном *ERBB2*) определяется в 10–35 % случаев рака молочной железы (ПМЖ) человека и ассоциируется с агрессивным течением заболевания, снижением чувствительности к химио- и гормонотерапии и в целом неблагоприятным прогнозом [1]. Этот генетический подтип ПМЖ характеризуется высокой частотой метастазов в нервную систему — в среднем 20 %, но может достигать 30–55 % [2]. Для лечения HER2-положительного (HER2⁺) метастатического ПМЖ в первую очередь применяют таргетные препараты, блокирующие рецепторы HER2 (трастузумаб, адо-трастузумаб эмтанзин, лапатиниб и др.) [3]. Патогенетическая анти-HER2-терапия позволяет увеличивать сроки ремиссии и выживаемость пациентов. Однако к такой терапии часто развивается резистентность, особенно в отношении метастазов в головной мозг. В связи с этим ведется поиск различных схем химиотерапии с применением известных противоопухолевых препаратов: таксанов, антрациклинов, а также цисплатина, циклофосфида, ломустина [4, 5]. Представляет интерес изучение активности препаратов этого ряда, в частности ломустина, с целью оценки целесообразности его применения при HER2⁺ ПМЖ. Выбор основан на том, что ломустин является одним из эффективных препаратов в лечении глиобластомы [6] и также используется при выявлении метастазов в головной мозг, часто сопутствующих HER2⁺ ПМЖ. Однако целесообразность применения ломустина при HER2⁺ ПМЖ исследована недостаточно.

Цель исследования — оценить ингибирующую активность ломустина на рост спонтанного HER2⁺ ПМЖ у самок мышей FVB/N.

Материалы и методы

Лабораторные животные. В работе использовали трансгенных самок мышей линии FVB/N, гомозиготных по HER2/neu, у которых к возрасту 12–14 мес в 100 % случаев развиваются спонтанные аденокарциномы молочной железы [7]. Эти трансгенные HER2/neu-мыши первоначально получены из Центра передовых технологий исследований старения (Анкона, Италия) и в течение нескольких лет содержатся и размножаются в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» (Санкт-Петербург, Россия). Мышей содержали по 5–7 особей в полипропиленовых клетках при стандартном режиме свет/темнота (по 12 ч), при окружающей температуре 22 ± 2 °C. Животные получали стандартный лабораторный корм (ПК-120, ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия) и водопроводную воду для питья *ad libitum*.

Препарат. В опытах использовали ломустин (содержимое капсул Ломустин медак, GmbH, Германия).

Дизайн исследования. В эксперименте использовали мышей-самок линии FVB/N в возрасте 5–6 мес с HER2⁺ опухолями молочной железы (аденокарциномами) разного размера (объемы от 139 до 600 мм³). В проспективном исследовании отобрано 14 мышей со спонтанными опухолями. Животных разделили на 7 пар таким образом, чтобы каждая мышь, получавшая ломустин, соответствовала контрольной мышью с аналогичным объемом опухоли. Ломустин

вводили перорально через зонд в дозе 50 мг/кг (в максимально переносимой дозе) однократно в виде 2,5 % водной суспензии в крахмале, так как этот препарат нерастворим в воде. Контрольным мышам перорально вводили 2,5 % крахмальную суспензию. За животными наблюдали в течение 30 дней, проводя ежедневный контроль их состояния, регулярное взвешивание и регистрацию объема опухолей после замеров. На 31-й день всех мышей подвергали вскрытию, а опухоли и другие ткани с макроскопически видимой патологией фиксировали в 10 % формалине и проводили их стандартную обработку для последующего гистологического изучения.

Критерии оценки противоопухолевого эффекта.

Активность препарата оценивали традиционными методами путем регистрации изменения объема опухолей с последующим расчетом коэффициента торможения роста опухолей (ТРО, %):

$$\text{ТРО \%} = (V_k - V_3) / V_k \times 100,$$

где V_k – средний объем опухоли в контроле, мм³; V_3 – средний объем опухоли в экспериментальной группе (у мышей, получавших ломустин), мм³.

Кроме того, определяли площадь под кинетической кривой роста опухоли, обозначая общую площадь как S , и рассчитывали индекс роста опухоли (ИРО) [8, 9]. ИРО выражает отношение S_3 в экспериментальной группе мышей, получавших ломустин, по сравнению с контролем S_k :

$$\text{ИРО \%} = S_3 / S_k \times 100.$$

Для измерения кинетики роста опухоли использовали метод трапеций [10]. ИРО является интегральным критерием действия препарата, позволяющим оценить не только степень противоопухолевой активности, но и ее продолжительность [8]. Очевидно, что ИРО в контроле всегда будет равен 100 %, тогда как в экспериментальной группе при регрессии, стабилизации или замедлении роста опухоли этот индекс будет меньше 100 %, а при стимуляции роста опухоли – больше 100 %.

Статистический анализ. Для статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism версии 8.0 (GraphPad Software, Inc., США). Суммарные данные в сравниваемых парах животных рассчитывали как среднее и стандартную ошибку среднего (*SEM*). Групповые различия оценивали с помощью критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Как можно видеть из данных таблицы, во всех парных группах у мышей, получавших ломустин, уже

к 11-м суткам объем опухолей достоверно уменьшался по сравнению с исходным (начало лечения) – в среднем в 5,2 раза. В контроле наблюдали быстрый рост спонтанных опухолей: на 11-е сутки – в 2,6 раза, а к 31-м суткам их объем увеличился в 8 раз. ТРО в результате введения ломустина отмечали во все сроки наблюдения (на 11, 21 и 31-е сутки). Показатель ТРО был достоверным, а его максимальное значение составило 92,3 % на 11-е сутки наблюдения.

Результаты оценки эффекта по площади под кинетической кривой роста (S) и ИРО также свидетельствовали о выраженном ингибирующем эффекте ломустина на рост спонтанного HER2⁺ РМЖ. Во всех 7 парах S_3 у мышей, получивших ломустин, была меньше, чем у соответствующих контрольных животных: минимум в 2,4 раза и максимум – в 18,5 раза. Соответственно ИРО составлял от 5,3 до 41,0 % в сравнении со 100 % в контроле. Показатель среднего значения S_3 в группе с ломустином был в 5,6 раза ниже контроля, а ИРО составил 18,8 % (в контроле 100 %; $p = 0,0006$).

Как известно, ломустин относится к соединениям из группы нитрозомочевины с алкилирующим механизмом действия [11]. Ломустин – жирорастворимое соединение, хорошо проникающее через гематоэнцефалический барьер [12]. Как видно из представленных результатов, ломустин обладает высоким ингибирующим воздействием на рост спонтанных HER2⁺ опухолей молочной железы у трансгенных мышей: ТРО составило от 92,3 до 77,8 % по сравнению с контролем ($p = 0,0006–0,007$), а ИРО – 18,8 % (100 % в контроле; $p = 0,0006$). В экспериментах мы использовали схему подбора пар мышей с одинаковыми объемами спонтанных опухолей (в группах контроля и с ломустином) и оценку эффекта при проспективном наблюдении. Такой подход в экспериментах на животных аналогичен проведению рандомизированного контролируемого клинического исследования с отбором пациентов по определенным критериям, например при определении эффективности исследуемого препарата.

В предыдущей публикации мы сообщали о тестировании активности ломустина на трансгенных мышках с HER2⁺ РМЖ, но с трансплантированным вариантом после перевивок спонтанной опухоли. В этих экспериментах суспензию опухолевых клеток трансплантировали мышам FVB/N двумя способами: внутримышечно (в бедренную мышцу) и интракраниально (в большое полушарие головного мозга). Ломустин при пероральном введении в дозе 50 мг/кг однократно ингибировал рост трансплантированного внутримышечно HER2⁺ РМЖ: ТРО составило от 96 до 52 % ($p < 0,0001$), а ИРО не превышал 33 % (против 100 % в контроле; $p < 0,001$). Лечение ломустином после интракраниальной трансплантации опухолей

Влияние ломустина на рост спонтанных HER2-позитивных опухолей молочной железы у трансгенных мышей
The effect of lomustine on the growth of spontaneous HER2-positive breast tumors in transgenic mice

Групповые пары мышей Group pairs of mice		Объем опухолей, мм ³ Tumor volume, mm ³			
		Дни от начала лечения Days from start of treatment			
		1-й* 1 st *	11-й 11 th	21-й 21 st	31-й 31 st
1	Контроль (n = 1) Control (n = 1)	139	309	538	1179
	Ломустин (n = 1) Lomustine (n = 1)	126	0	0	40
2	Контроль (n = 1) Control (n = 1)	600	600	1120	1152
	Ломустин (n = 1) Lomustine (n = 1)	600	6	0	75
3	Контроль (n = 1) Control (n = 1)	416	1210	1690	2228
	Ломустин (n = 1) Lomustine (n = 1)	426	271	115	322
4	Контроль (n = 1) Control (n = 1)	208	386	1173	3000
	Ломустин (n = 1) Lomustine (n = 1)	206	12	276	1566
5	Контроль (n = 1) Control (n = 1)	309	538	1179	3115
	Ломустин (n = 1) Lomustine (n = 1)	338	75	432	1460
6	Контроль (n = 1) Control (n = 1)	287	1208	2773	4081
	Ломустин (n = 1) Lomustine (n = 1)	322	6	6	320
7	Контроль (n = 1) Control (n = 1)	316	1577	2781	3464
	Ломустин (n = 1) Lomustine (n = 1)	322	75	350	454
Средний объем опухолей, мм ³ , торможение роста опухолей, % Tumor volume average, mm ³ , tumor growth inhibition, %					
Контроль (n = 1) Control (n = 1)		325 ± 56	833 ± 186	1608 ± 377	2603 ± 426
Ломустин (n = 1) Lomustine (n = 1)		334 ± 58	64 ± 37	168 ± 69	605 ± 241
		100 %	92,3 %	89,5 %	77,8 %
		p = 0,64	p = 0,0006	p = 0,0006	p = 0,007

*День введения крахмальной суспензии (контроль) и ломустина (50 мг/кг).

Примечание. p – достоверность к контролю.

*The day of administration of a starch suspension (control) and lomustine (50 mg/kg).

Note. p – reliability to control.

увеличивало медиану продолжительности жизни животных на 43 %, или до 30 дней, по сравнению с 21-м днем в контроле ($p < 0,001$) [13], т.е. препарат ингибировал развитие мозговых трансплантатов HER2⁺ РМЖ. Отметим, что внутричерепная трансплантация рассматривается как один из методов моделирования процесса метастазирования опухолей в головной мозг [14].

Интересные данные были получены F. Fisusi и соавт. [15], которые изучали активность ломустина и конъюгата ломустина с наночастицами (полимер МЕТ) в ортотопической модели с внутричерепной инъекцией клеток глиобластомы человека (U-87 MG) у иммунодефицитных голых мышей. Ломустин-МЕТ, но не ломустин, был эффективен и значительно

увеличивал выживаемость мышей с опухолями. К сожалению, клеточная линия глиобластомы человека U-87 MG показала низкую экспрессию HER2/neu [16, 17].

Имеются экспериментальные данные о противоопухолевом действии некоторых таргетных анти-HER2-препаратов, хотя достоверно сравнить их активность с ломустинном не представляется возможным. В частности, препарат mAb 4D5, мышинный аналог трастузумаба, изучали на модели с внутричрепной трансплантацией мышинных трансгенных клеток РМЖ, экспрессирующих HER2 человека (клеточные линии Fo2–1282 или Fo5) [18]. Этот препарат, вводимый внутривентриально 1 раз в неделю в течение 3 нед в дозах 20 и 30 мг/кг антитела, значительно увеличивал выживаемость (в среднем более чем на 50 дней). В аналогичных экспериментах трастузумаб эмтанзин (препарат Т-DM1) также повышал выживаемость мышей с интракраниально трансплантированными клетками HER2⁺ РМЖ [18].

В обзоре Е.А. Fry и соавт. [19] приводятся данные о терапевтической активности некоторых других таргетных препаратов у трансгенных мышей с HER2⁺ РМЖ. Кроме того, в настоящее время показано,

что развитие спонтанного канцерогенеза у трансгенных мышей с HER2⁺ РМЖ могут ингибировать многие синтетические и природные вещества (ресвератрол, пептид эпителина, метформин, мелатонин и пр.) с различным механизмом действия (антиоксидантным, противовоспалительным, иммуномодулирующим и др.) [19–23]. Результаты этих экспериментов относятся к химиопрофилактике рака [24]. Формально их нельзя сравнивать, поскольку химиотерапия рака представляет собой ингибирующее действие препаратов на рост уже развившихся опухолей в большинстве случаев как результат цитостатического и цитотоксического действий на опухолевые клетки.

Заключение

Ломустин проявляет выраженное противоопухолевое действие на модели спонтанного HER2⁺ РМЖ у трансгенных мышей, хотя не является анти-HER2-таргетным препаратом. Полученные нами результаты свидетельствуют о целесообразности применения ломустина у больных с HER2⁺ РМЖ как препарата с возможным действием не только на церебральные метастазы, но и на первичную опухоль.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gheni N., Westenberg D. Quantitative real-time PCR assay with immunohistochemical evaluation of HER2/neu oncogene in breast cancer patients and its correlation with clinicopathological findings. *Indian J Pathol Microbiol* 2020;63(Suppl.):S.123–8. DOI: 10.4103/IJPM.IJPM_136_19
- Zimmer A.S., Van Swearingen A.E.D., Anders C.K. HER2-positive breast cancer brain metastasis: A new and exciting landscape. *Cancer Rep (Hoboken)* 2022;5(4):e1274. DOI: 10.1002/cnr2.1274
- Kunte S., Abraham J., Montero A.J. Novel HER2-targeted therapies for HER2-positive metastatic breast cancer. *Cancer* 2020;126(19):4278–88. DOI: 10.1002/cncr.33102
- Тюляндин С.А., Артамонова Е.В., Жукова Л.Г. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO #3s2 2022;12:155–97. DOI: 10.18027/2224-5057-2022-12-3s2-155-197
Tyulyandin S.A., Artamonova E.V., Zhukova L.G. et al. Practical recommendations for the drug treatment of breast cancer. *Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumors: Practice Guidelines RUSSCO #3s2 2022;12:155–97. (In Russ.)*. DOI: 10.18027/2224-5057-2022-12-3s2-155-197
- Bredin P., Walshe J.M., Denduluri N. Systemic therapy for metastatic HER2-positive breast cancer. *Semin Oncol* 2020;47(5):259–69. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2020.07.008
- Weller M., Le Rhun E. How did lomustine become standard of care in recurrent glioblastoma? *Cancer Treat Rev* 2020;87:102029. DOI: 10.1016/j.ctrv.2020.102029
- Panchenko A.V., Popovich I.G., Trashkov A.P. et al. Biomarkers of aging, life span and spontaneous carcinogenesis in the wild type and HER-2 transgenic FVB/N female mice. *Biogerontology* 2016;17(2):317–24. DOI: 10.1007/s10522-015-9611-y
- Стуков А.Н., Иванова М.А., Никитин А.К. и др. Индекс роста опухоли как интегральный критерий эффективности противоопухолевой терапии в эксперименте. *Вопросы онкологии* 2001;47(5):616–8. PMID: 11785106
Stukov A.N., Ivanova M.A., Nikitin A.K. et al. Tumor growth index as an integral criterion for the effectiveness of antitumor therapy in the experiment. *Voprosy onkologii = Issues of oncology* 2001;47(5):616–8 (In Russ.). PMID: 11785106
- Duan F., Simeone S., Wu R. et al. Area under the curve as a tool to measure kinetics of tumor growth in experimental animals. *J Immunol Methods* 2012;382(1–2):224–8. DOI: 10.1016/j.jim.2012.06.005
- Holder D.J., Hsuan F., Dixit R., Soper K. A method for estimating and testing area under the curve in serial sacrifice, batch, and complete data designs. *J Biopharm* 1999;9(3):451–64. DOI: 10.1081/BIP-100101187
- Weiss R.B., Issell B.F. The nitrosoureas: carmustine (BCNU) and lomustine (CCNU). *Cancer Treat Rev* 1982;9(4):313–30. DOI: 10.1016/s0305-7372(82)80043-1
- Lee F.Y., Workman P., Roberts J.T., Bleehe N.M. Clinical pharmacokinetics of oral CCNU (lomustine). *Cancer Chemother Pharmacol* 1985;14(2):125–31. DOI: 10.1007/BF00434350
- Стуков А.Н., Вершинина С.Ф., Козьявин Н.А. и др. Изучение активности ломустина при перевиваемом HER2-положительном раке молочной железы у мышей линии FVB/N, трансгенных по HER2. *Сибирский онкологический журнал* 2019;18(5):54–60. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-54-60
Stukov A.N., Verшинina S.F., Koziavin N.A. et al. Study of the effect of lomustin on HER2-positive breast cancer in FVB/N HER-2 transgenic mice. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2019;18(5):54–60 (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-54-60

14. Cruz-Muñoz W., Kerbel R.S. Preclinical approaches to study the biology and treatment of brain metastases. *Semin Cancer Biol* 2011;21(2):123–30. DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.12.001
15. Fisusi F.A., Siew A., Chooi K.W. et al. Lomustine nanoparticles enable both bone marrow sparing and high brain drug levels – A strategy for brain cancer treatments. *Pharm Res* 2016;33(5):1289–303. DOI: 10.1007/s11095-016-1872-x
16. Mineo J.F., Bordron A., Quintin-Roué I. et al. Recombinant humanised anti-HER2/neu antibody (Herceptin) induces cellular death of glioblastomas. *Br J Cancer* 2004;91(6):1195–9. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602089
17. Cui H., Cheng Y., Piao S.Z. et al. Correlation between HER-2/neu(erbB-2) expression level and therapeutic effect of combination treatment with HERCEPTIN and chemotherapeutic agents in gastric cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 2014;14(1):10. DOI: 10.1186/1475-2867-14-10
18. Lewis Phillips G.D., Nishimura M.C., Lacap J.A. et al. Trastuzumab uptake and its relation to efficacy in an animal model of HER2-positive breast cancer brain metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2017;164(3):581–91. DOI: 10.1007/s10549-017-4279-4
19. Fry E.A., Taneja P., Inoue K. Clinical applications of mouse models for breast cancer engaging HER2/neu. *Integr Cancer Sci Ther* 2016;3(5):593–603. DOI: 10.15761/ICST.1000210
20. Provinciali M., Re F., Donnini A. et al. Effect of resveratrol on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer* 2005;115(1):36–45. DOI: 10.1002/ijc.20874
21. Anisimov V.N., Khavinson V.K., Provinciali M. et al. Inhibitory effect of the peptide epitalon on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer* 2002;101(1):7–10. DOI: 10.1002/ijc.10570
22. Anisimov V.N., Berstein L.M., Egormin P.A. et al. Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Exp Gerontol* 2005;40(8-9):685–93. DOI: 10.1016/j.exger.2005.07.007
23. Anisimov V.N., Alimova I.N., Baturin D.A. et al. The effect of melatonin treatment regimen on mammary adenocarcinoma development in HER-2/neu transgenic mice. *Int J Cancer* 2003;103(3):300–5. DOI: 10.1002/ijc.10827
24. Al Rabadi L., Bergan R. A way forward for cancer chemoprevention: Think local. *Cancer Prev Res (Phila)* 2017;10(1):14–35. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0194

Вклад авторов

В.А. Александров: концепция, анализ полученных результатов, написание статьи;
 А.Н. Стуков: дизайн опытов, проведение экспериментов и систематизация материала;
 Ю.Г. Змитриченко, О.А. Беляева: проведение экспериментов на животных и систематизация материала;
 Г.В. Точильников: редактирование текста статьи, финальное утверждение рукописи.

Author's contributions:

V.A. Alexandrov: concept and design of experiments, analysis of the results, writing an article;
 A.N. Stukov: design of experiments, conducting experiments and systematizing the material;
 Yu.G. Zmitrichenko, O.A. Belyaeva: conducting experiments and systematizing the material;
 G.V. Tochilnikov: article editing, final approval of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.А. Александров / V.A. Alexandrov: <https://orcid.org/0000-0002-0019-2685>
 А.Н. Стуков / A.N. Stukov: <https://orcid.org/0000-0002-1741-6630>
 Ю.Г. Змитриченко / Yu.G. Zmitrichenko: <https://orcid.org/0000-0002-9137-9532>
 О.А. Беляева / O.A. Belyaeva: <https://orcid.org/0009-0004-2201-5796>
 Г.В. Точильников / G.V. Tochilnikov: <https://orcid.org/0000-0003-4232-8170>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

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.

Compliance with principles of bioethics. The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes.

Статья поступила: 28.06.2023. Принята в печать: 26.11.2023.

Article received: 28.06.2023. Accepted for publication: 26.11.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-51-57>

Цитопатогенное действие нативного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* на клетки линии CHO-K1

Е.А. Курбатова, И.В. Яковлева, Н.Ф. Гаврилова, Е.С. Петухова, И.Б. Семенова, А.Е. Зайцев, Ю.В. Волох, А.Ю. Леонова, А.В. Поддубиков

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А

Контакты: Екатерина Алексеевна Курбатова kurbatova6162@yandex.ru

Введение. *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, пневмококк) – условно-патогенные бактерии, вызывающие воспалительные заболевания у человека. Одним из факторов вирулентности *S. pneumoniae* является пневмолизин (Ply) – холестеролзависимый гемолитический токсин, который при взаимодействии с холестеринем клеточных мембран эукариотов формирует поры и приводит к разрушению и гибели клеток.

Цель исследования – иммунохимическая характеристика Ply и оценка его цитотоксического действия в культуре клеток яичника китайского хомячка CHO-K1.

Материалы и методы. Для получения Ply штамм *S. pneumoniae* серотипа 3 культивировали в сердечно-мозговом бульоне, осаждали бактериальные клетки центрифугированием и подвергали ультразвуковой дезинтеграции. Наличие Ply в полученном препарате подтверждали с помощью иммуноблоттинга с моноклональными антителами к рекомбинантному Ply. Цитопатогенное действие Ply исследовали на культуре пролинзависимых эпителиоподобных клеток яичника китайского хомячка CHO-K1 в среде RPMI-1640. Гемолитическую активность Ply оценивали в реакции с эритроцитами мыши.

Результаты. Методом ультразвуковой дезинтеграции клеток штамма *S. pneumoniae* серотипа 3 с последующим осаждением сульфатом аммония получен белок, образующий на электрофореze полосу, соответствующую молекулярной массе Ply (53 кДа). Полученный белок обладал способностью лизировать эритроциты мыши. Подлинность Ply подтверждена в иммуноблоттинге с моноклональными антителами к рекомбинантному Ply. Ply оказывал цитопатогенное действие на клетки яичника китайского хомячка CHO-K1. Минимальная доза препарата, индуцирующая токсическое действие на клетки, проявляющаяся в появлении наряду с нормальными клетками округлых и мелких клеток, составляла 16,4 мкг/мл по белку. При увеличении концентрации до 65,6 мкг/мл обнаруживали только мелкие круглые клетки. Дальнейшее увеличение концентрации приводило к полной деструкции клеток CHO-K1.

Заключение. Пневмолизин можно использовать для разработки новых лекарственных средств, предназначенных для терапии пневмококковых инфекций.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, пневмолизин, иммуноблоттинг, клетки CHO-K1, цитопатогенное действие

Для цитирования: Курбатова Е.А., Яковлева И.В., Гаврилова Н.Ф. и др. Цитопатогенное действие нативного пневмолизина *Streptococcus pneumoniae* на клетки линии CHO-K1. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):51–7. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-51-57>

Cytopathogenic effect of *Streptococcus pneumoniae* native pneumolysin in CHO-K1 cells

Ekaterina A. Kurbatova, Irina V. Yakovleva, Natalya F. Gavrilova, Ekaterina S. Petukhova, Irina B. Semenova, Anton E. Zaitsev, Yury V. Volokh, Anna Yu. Leonova, Alexander V. Poddubikov

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russia

Contacts: Ekaterina Alexeevna Kurbatova kurbatova6162@yandex.ru

Background. *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, pneumococci) is an opportunistic bacterium that causes inflammatory diseases in humans. One of the virulence factors of *S. pneumoniae* is pneumolysin (Ply), a cholesterol-dependent

hemolytic toxin that interacts with cholesterol in eukaryotic cell membranes, forms pores and leads to cell destruction and death.

Aim. Immunochemical characteristics of pneumolysin and evaluation of its cytotoxic effect in the culture of Chinese hamster ovarian cells CHO-K1.

Materials and methods. To obtain Ply, the *S. pneumoniae* serotype 3 strain was cultivated in brain heart broth, bacterial cells were pelleted by centrifugation and subjected to ultrasonic disintegration. The presence of pneumolysin in the resulting preparation was confirmed by immunoblotting with monoclonal antibodies to recombinant pneumolysin. The cytopathogenic effect of Ply was studied in a culture of proline-dependent epithelial-like Chinese hamster ovary cells CHO-K1 in RPMI-1640 medium. The hemolytic activity of Ply was assessed in a reaction with mouse erythrocytes.

Results. Using ultrasonic disintegration of cells of the *S. pneumoniae* serotype 3 strain followed by precipitation with ammonium sulfate, a protein that formed a band on electrophoresis at a level corresponding to the molecular weight of Ply (53 kDa) was obtained. The protein possessed the ability to lyse mouse erythrocytes. The authenticity of Ply was confirmed by immunoblotting with monoclonal antibodies to recombinant pneumolysin. Ply had a cytopathogenic effect on Chinese hamster ovary CHO-K1 cells. The minimum dose of the protein that induced a toxic effect on cells, manifested in the appearance of round and small cells along with normal cells, was 16.4 µg/ml per protein. When the concentration was increased up to 65.6 µg/ml, only small round cells were detected. Further increase in concentration resulted in complete destruction of CHO-K1 cells.

Conclusion. Pneumolysin can be used to develop new drugs for the treatment of pneumococcal infections.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, pneumolysin, immunoblotting, CHO-K1, cytopathogenic effect

For citation: Kurbatova E.A., Yakovleva I.V., Gavrilova N.F. et al. Cytopathogenic effect of *Streptococcus pneumoniae* native pneumolysin in CHO-K1 cells. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):51–7. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-51-57>

Введение

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*, пневмококк) — грамположительные бактерии, вызывающие у человека пневмонию, отит, менингит, сепсис и другие заболевания [1, 2]. Факторами патогенности пневмококка являются капсульные полисахариды *S. pneumoniae*, на основе которых разработаны и применяют мультивалентные полисахаридные и конъюгированные пневмококковые вакцины [3]. Наряду с капсульными полисахаридами существенную роль в патогенезе пневмококковой инфекции играют белки *S. pneumoniae*, в частности пневмоллизин (Ply) — гемолитический токсин пневмококка с М. м. 53 кДа, который, взаимодействуя с холестерином клеточных мембран эукариотов, формирует поры, приводя к разрушению клеток [4–6].

В настоящее время идет активный поиск молекул, обладающих прямой или непрямой Ply-ингибирующей активностью, и проводятся исследования по изучению механизмов ингибирования токсических свойств Ply [7]. Большое количество исследований посвящено получению и изучению свойств рекомбинантного Ply (rPly) [2, 8]. Рекомбинантные белки, синтезированные с помощью генно-инженерных технологий, являются аналогами нативных белков, однако могут отличаться от них иной конформационной структурой, склонностью к фрагментации под действием протеаз экспрессирующей системы, в также могут быть контаминированы эндотоксином вектора экспрессии, что требуют дополнительной очистки от примесей [9]. В связи с этим получение

нативного Ply (nPly), обладающего естественной конформационной структурой белка и присущей ему токсичностью, явилось необходимым условием для исследования его иммунохимических и цитотоксических свойств.

Цель исследования — иммунохимическая характеристика Ply *S. pneumoniae* и его цитотоксического действия на клетки яичника китайского хомячка СНО-K1.

Материалы и методы

Для получения Ply использовали штамм *S. pneumoniae* серотипа (центр коллективного пользования ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова»). Штамм восстанавливали из лиофилизированного состояния в 1 % сахарном бульоне и через 6–8 ч культивирования пересеивали на кровяной агар. После этого в течение 16–18 ч культивировали в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия) при температуре 37 °C в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 5 % концентрации CO₂. Полученную бактериальную культуру *S. pneumoniae* осаждали центрифугированием (4000 об/мин в течение 30 мин). Осажденные клетки дважды отмывали 0,9 % раствором натрия хлорида центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин. Затем прибавляли 30 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и разрушали бактериальные клетки ультразвуком (10 периодов воздействия ультразвука по 30 с) на ультразвуковом дезинтеграторе UD-20 (Techpan, Польша). Акустическую обработку клеток проводили на льду для

предотвращения перегрева проб. Полученный дезинтеграт центрифугировали (7000 об/мин в течение 60 мин), затем отбирали надосадочную жидкость и добавляли к ней насыщенный раствор аммония сульфата до 70 % насыщения. Суспензию оставляли при температуре 4 °С на ночь для образования осадка белка. Взвесь с осадком центрифугировали (5000 об/мин в течение 40 мин), получившийся осадок растворяли в 1,5 мл 0,15М фосфатного буфера (рН = 7,2). Полученный препарат диализовали против того же буфера, разливали на аликвоты и хранили при температуре –20 °С или лиофильно высушивали, используя в качестве стабилизатора 5 % лактозу.

Концентрацию белка определяли на спектрофотометре Genesis (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волн 215 и 225 нм по следующей формуле:

$$[\text{белок}] \text{ мкг/мл} = 144 (A_{215} - A_{225}) \times b,$$

где 144 — эмпирически вычисленный коэффициент, A — оптическая плотность, b — разведение пробы [10].

Содержание белка составило $(4,2 \pm 0,5)$ мг/мл.

Электрофоретическое разделение белков проводили с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [11] с использованием маркера молекулярных весов (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Гель окрашивали 0,25 % раствором Кумасси (AppliChem, Германия). Наличие Ply в препарате подтверждали с помощью иммуноблоттинга [12] с моноклональными антителами к полноразмерному rPly [13].

Полученный образец обладал гемолитической активностью, что было доказано путем гемолиза 1 % суспензии эритроцитов мыши ($n = 2$). Мыши линии BALB/с получены из питомника ООО «СМК СТЕЗАР» (г. Владимир). Животных содержали в условиях вивария в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными. Дизайн исследования одобрен этическим комитетом ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова». Конечное разведение образца, вызывающее гемолиз эритроцитов, составило 1:512, что соответствовало 8 мкг/мл белка.

Цитопатогенное действие Ply, входящего в состав полученного образца, исследовали на культуре пролинзависимых эпителиоподобных клеток яичника китайского хомячка CHO-K1 в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и канамицина из расчета 200 ЕД на 1 мл среды. Расчет доз проводили по содержанию общего белка. В лунки 96-луночного культурального микропланшета (Thermo Fisher Scientific, США) вносили по 100 мкл серийных двукратных разведений образца в дозах от 2100 до 1 мкг/мл среды культивирования. Затем прибавляли в каждую лунку по 10^4 клеток CHO-K1 в 100 мкл культуральной среды. Планшеты культи-

вировали при температуре 37 °С в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 5 % концентрации CO₂. Подсчет клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа (Leitz, Германия). Результаты реакции оценивали через 24 и 48 ч. За 1 цитопатогенную единицу (ЦПЕ) принимали наименьшую концентрацию белка, индуцирующую полное разрушение клеток. В качестве отрицательного контроля использовали серийные двукратные разведения фосфатно-солевого буфера в RPMI-1640, в качестве положительного контроля — двукратные разведения очищенного дифтерийного токсина (ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», г. Уфа) начиная с 0,125 Лф/мл. Микрофотографии получали с помощью инвертированного микроскопа Leica DMi8 (Leica, Германия) с программным обеспечением LAS V 4.12 (объектив 10×, окуляр 10, увеличение 100). Размер изображения — 1245 × 93,75 мкм. Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова». Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10 методом Вилкоксона для зависимых выборок. Результат представляли как $M \pm SD$, где M — среднее значение, SD — стандартное отклонение. Результат считали статистически значимым при $p \leq 0,05$.

Результаты

При проведении электрофореза полученного образца выявлена мажорная белковая полоса на уровне 52–55 кДа (рис. 1, а). Методом иммуноблоттинга

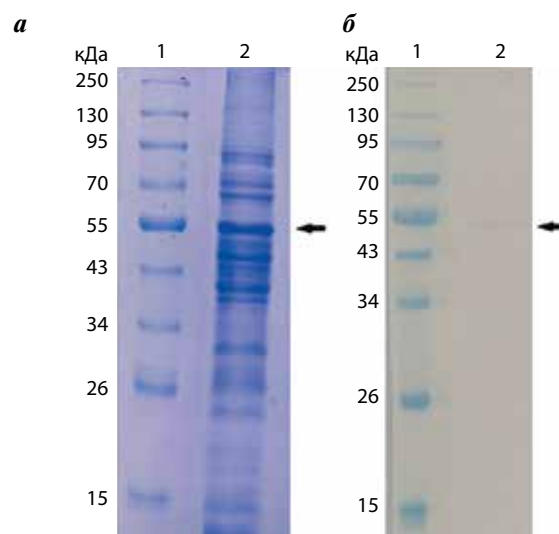


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле, окрашивание Кумасси R-250 (а); нитроцеллюлозная мембрана после иммуноблоттинга с моноклональными антителами к рекомбинантному пневмолизину (б): 1 — маркер молекулярной массы; 2 — исследуемый образец

Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis, Coomassie R-250 staining (a); nitrocellulose membrane after immunoblotting with monoclonal antibodies to recombinant pneumolysin (b): 1 — molecular weight marker; 2 — test sample

с моноклональными антителами, специфичными к полноразмерному rPly, доказано соответствие выявленной на уровне 53 кДа полосы rPly (рис. 1, б).

Цитопатогенное действие Ply оценивали на культуре CHO-K1 по форме и размеру клеток, меняющихся под действием токсина. Результат учитывали через

Цитопатогенное действие нативного пневмолизина
Cytopathogenic effect of native pneumolysin

Бактериальный токсин Bacterial toxin	№	Доза, мкг/мл Dose, µg/mL	Количество клеток CHO-K1 с нормальной морфологией, % Number of CHO-K1 cells with normal morphology, %		Форма и размер клеток Shape and size of cells
			24 ч 24 h	48 ч 48 h	
Фосфатно-солевой буфер + RPMI-1640 (контроль) Phosphate-buffered saline + RPMI-1640 (control)	1	0	98,2 ± 0,9	97,5 ± 1,2	Веретенообразные, крупные Fusiform, large
Ply-содержащий препарат, мкг/мл Ply-containing drug, µg/mL	2	1,0	98,5 ± 0,5	98,2 ± 1,4	Веретенообразные, крупные Fusiform, large
	3	2,0	97,0 ± 1,6	97,5 ± 0,8	Веретенообразные, крупные Fusiform, large
	4	4,1	97,5 ± 0,5	98,5 ± 0,8	Веретенообразные, крупные Fusiform, large
	5	8,2	97,2 ± 0,9	97,6 ± 1,3	Веретенообразные, крупные Fusiform, large
	6	16,4	28,7 ± 2,9*	27,5 ± 2,6*	Веретенообразные, округлые (мало), мел- кие круглые Fusiform, rounded (small number), small round
	7	32,8	6,0 ± 2,6*, **	4,3 ± 2,5*, **	Веретенообразные крупные (единичные в поле зрения), округлые (единичные в поле зрения), мелкие круглые (много) Fusiform large (single in the field of view), rounded (single in the field of view), small round (many)
	8	65,6	0	0	Мелкие круглые Small round
	9	131,2			Мелкие круглые Small round
	10	262,5			Мелкие круглые Small round
	11	525			Мелкие круглые, фрагменты клеток Small round, fragments of cells
	12	1050			Мелкие круглые (мало), клеточный детрит, оболочки клеток Small round (small amount), cellular detritus, cell membranes
	13	2100			Мелкие круглые (мало), клеточный детрит, оболочки клеток Small round (small amount), cellular detritus, cell membranes
Дифтерийный токсин, Lf Diphtheria toxin, Lf	14	0,125— 0,00025			Полная гибель клеток через 48 ч Complete cell death in 48 h

*Достоверность различий между группами 1 (контроль) и 6, 7; **с группами 6 и 7, p < 0,05.
*Significance of differences between groups 1 (control) and 6, 7; **with groups 6 and 7, p < 0.05.

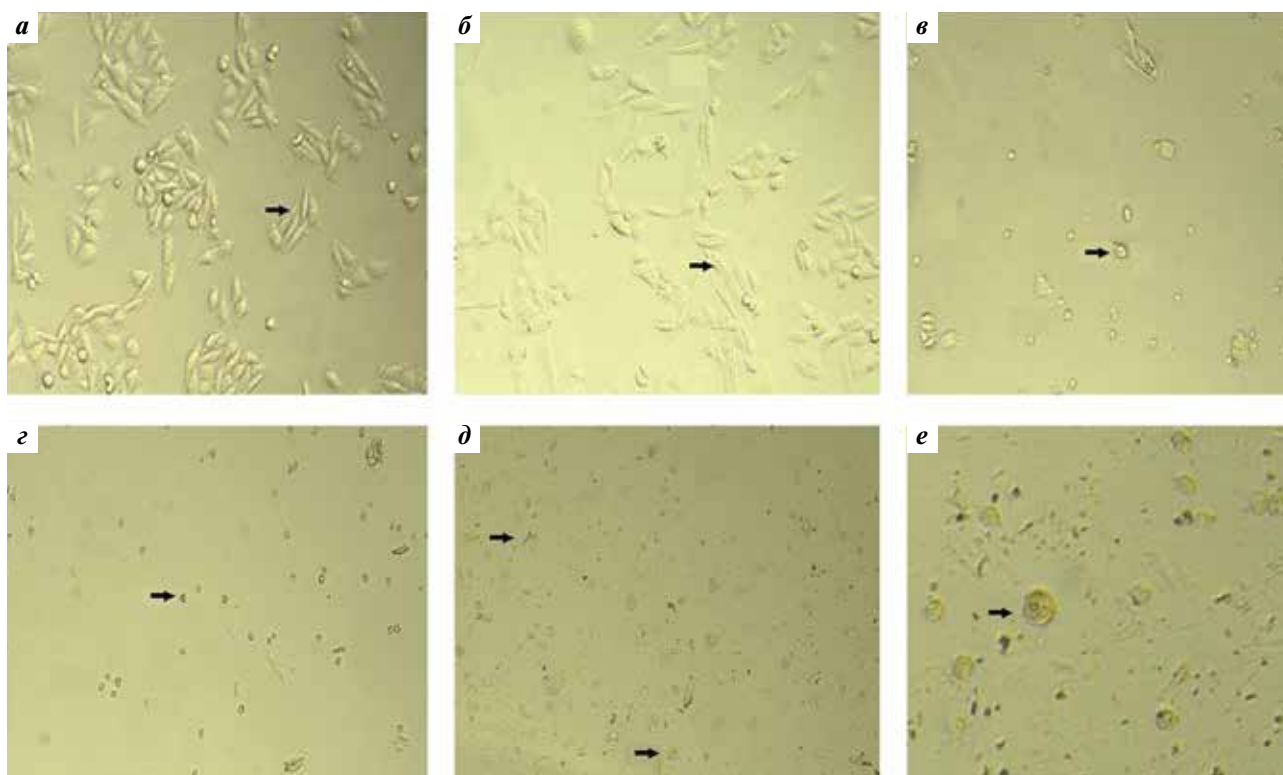


Рис. 2. Эффект действия пневмолизина на клетки СНО-К1 через 24 ч. Микрофотография лунок планшета: а – фосфатно-солевой буфер (контроль – нормальные веретенообразные клетки); б – 1 мкг/мл (нормальные веретенообразные клетки); в – 16,4 мкг/мл (большие округлые клетки – некроптоз); г – 65,6 мкг/мл (мелкие круглые клетки – пироптоз); д – 1050 мкг/мл (клеточный детрит – верхняя стрелка и апоптотические тельца – нижняя стрелка); е – увеличенный фрагмент изображения рис. д с апоптотическими тельцами ($\times 100$, объектив 10 $\times$, окуляр 10). Стрелками указаны фрагменты изображения, описанные в тексте

Fig. 2. Effect of pneumolysin on CHO-K1 cells, 24 h. Microphotography of the wells of the plate: а – phosphate-buffered saline (control – normal fusiform cells); б – 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (normal fusiform cells); в – 16.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (large rounded cells – necroptosis); г – 65.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (small round cells – pyroptosis); д – 1050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (cellular detritus – upper arrow and apoptotic corpuscles); е – an enhanced fragment of the image of fig. д with apoptotic corpuscles ($\times 100$, lens 10 $\times$, eyepiece 10). The arrows indicate the fragments of the image described in the text

24 и 48 ч. В качестве референс-препарата использовали очищенный дифтерийный токсин (см. таблицу).

Независимо от срока исследования в концентрациях от 1,0 до 8,2 мкг/мл (в расчете на общий белок) Ply не оказывал токсического действия на клетки СНО-К1. Клетки сохраняли присущую им веретенообразную форму, как и в контроле (рис. 2, а, б). Через 24 ч инкубации после внесения в клеточную культуру Ply в концентрации 16,4 мкг/мл наряду с веретенообразными клетками появлялись большие округлившиеся клетки, характерные для некроптоза, тогда как число нормальных клеток резко снижалось по сравнению с контролем (рис. 2, в). При внесении в культуру клеток 65,6 и 131,2 мкг/мл Ply обнаруживали только мелкие круглые клетки (рис. 2, г). Дальнейшее увеличение концентрации от 525 до 2100 мкг/мл приводило к уменьшению количества мелких круглых клеток, их деструкции, появлению клеточного детрита и апоптотических телец, представляющих собой фрагменты клетки, ограниченные плаз-

матической мембраной (рис. 2, д, е). Апоптотические тельца появлялись вследствие апоптоза клеток; 1 ЦПЕ составила 65,6 мкг/мл. Различий между результатами, полученными через 24 и 48 ч, не выявлено. Цитопатогенное действие дифтерийного токсина на клетки СНО-К1 учитывали через 48 ч; 1 ЦПЕ составляла 0,00025 Lf/мл.

Заключение

Показано, что nPly с М. м. 53 кДа взаимодействовал с моноклональными антителами к полноразмерному rPly и оказывал цитопатогенное действие на клетки СНО-К1. Ply вызывал гибель клеток СНО-К1 путем некроптоза, заключающегося в набухании клетки, ее округлении и увеличении проницаемости плазматической мембраны, приводящей к высвобождению ее содержимого во внеклеточное пространство, пироптоза, проявляющегося в нарушении целостности цитоплазматической мембраны и быстрым высвобождением в окружающую среду содержимого клетки с резким уменьшением ее размеров, а также

апоптоза с образованием апоптотических телец и разрушения клеток.

Последние исследования показали, что тремя основными типами запрограммированной гибели клеток являются апо-, пиро- и некроптоз, в процессе каждого из которых задействованы сложные молекулярные и клеточные механизмы [14]. В проведенном нами исследовании выраженность проявления того или иного пути гибели клеток зависела от дозы Ply. Через сутки после прибавления nPly к культуре клеток, меньшие его дозы вызывали некроптоз, увеличение дозы приводило к пироптозу, а самые большие дозы вызывали полное разрушение клеток путем апоптоза.

Обладающий цитотоксической активностью Ply *S. pneumoniae* может быть использован для про-

ведения дальнейших исследований по разработке методов снижения его токсичности с помощью различных молекул, в том числе моноклональных антител. Детоксицированный Ply целесообразно исследовать в экспериментах на животных для оценки его способности индуцировать образование антител и вызывать внутривидовую перекрестную защиту от заражения различными серотипами пневмококка.

Работа выполнена с использованием научного оборудования и штаммов коллекции центра коллективного пользования «НИИВС им. И.И. Мечникова» при финансовой поддержке проекта Российской Федерации в лице Минобрнауки России, соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Andre G.O., Converso T.R., Politano W.R. et al. Role of *Streptococcus pneumoniae* proteins in evasion of complement-mediated immunity. *Front Microbiol* 2017;8:224. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00224
2. Briles D.E., Paton J.C., Mukerji R. et al. Pneumococcal vaccines. *Microbiol Spectr* 2019;7(6). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0028-2018
3. Croucher N.J., Løchen A., Bentley S.D. Pneumococcal vaccines: Host interactions, population dynamics, and design principles. *Annu Rev Microbiol* 2018;72:521–49. DOI: 10.1146/annurev-micro-090817-062338
4. Gonzalez-Juarbe N., Bradley K.M., Riegler A.N. et al. Bacterial pore-forming toxins promote the activation of caspases in parallel to necroptosis to enhance alarmin release and inflammation during pneumonia. *Sci Rep* 2018;8(1):5846. DOI: 10.1038/s41598-018-24210-8
5. Nishimoto A.T., Rosch J.W., Tuomanen E.I. Pneumolysin: Pathogenesis and therapeutic target. *Front Microbiol* 2020;11:1543. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01543
6. Pereira J.M., Xu S., Leong J.M., Sousa S. The yin and yang of pneumolysin during pneumococcal infection. *Front Immunol* 2022;13:878244. DOI: 10.3389/fimmu.2022.878244
7. Cima Cabal M.D., Molina F., López-Sánchez J.I. et al. Pneumolysin as a target for new therapies against pneumococcal infections: A systematic review. *PLoS One* 2023;18(3):e0282970. DOI: 10.1371/journal.pone.0282970
8. Wu J., Wu K., Xu W. et al. Engineering detoxified pneumococcal pneumolysin derivative ΔA146PLY for self-biomineralization of calcium phosphate: Assessment of their protective efficacy in murine infection models. *Biomaterials* 2018;155:152–64. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.018
9. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front Microbiol* 2014;5:172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172
10. Segel I.H. Biochemical calculations: How to solve mathematical problems in general biochemistry. New-York, London, Sydney, Toronto: John Wiley & Sons Inc., 1976. 441 p.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680–5. DOI: 10.1038/227680a0
12. Burnette W.N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112(2):195–203. DOI: 10.1016/0003-2697(81)90281-5
13. Vorobyev D.S., Sidorov A.V., Kaloshin A.A. et al. Preparation a recombinant form of pneumolysin protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Bull Exp Biol Med* 2023;174(6):749–53. DOI: 10.1007/s10517-023-05785-3
14. Ketelut-Carneiro N., Fitzgerald K.A. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis-Oh My! The many ways a cell can die. *J Mol Biol* 2022; 434(4):167378. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.167378

Вклад авторов

Е.А. Курбатова: анализ и обобщение результатов;
И.В. Яковлева: исследование цитотоксического действия;
Н.Ф. Гаврилова: иммунохимические исследования;
Е.С. Петухова: электрофорез и иммуноблоттинг;
И.Б. Семенова: анализ литературы по теме статьи;
А.Е. Зайцев: статистическая обработка данных;
Ю.В. Волох: получение образцов крови животных;
А.Ю. Леонова: культивирование штаммов микроорганизмов;
А.В. Поддубиков: получение антигенов микробных клеток.

Author's contributions

E.A. Kurbatova: analysis and summarizing the results;
I.V. Yakovleva: cytotoxic test;
N.F. Gavrilova: immunochemical studies;
E.S. Petukhova: electrophoresis and immunoblotting;
I.B. Semenova: literature analysis on the topic of the article;
A.E. Zaitsev: statistical analysis;
Yu.V. Volokh: obtaining animal blood samples;
A.Yu. Leonova: cultivation of strains of microorganisms;
A.V. Poddubikov: obtaining antigens of microbial cells.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Курбатова / E.A. Kurbatova: <https://orcid.org/0000-0002-0282-4471>;
И.В. Яковлева / I.V. Yakovleva: <https://orcid.org/0000-0001-5123-2651>;
Н.Ф. Гаврилова / N.F. Gavrilova: <https://orcid.org/0000-0001-6704-0339>;
Е.С. Петухова / E.S. Petukhova: <https://orcid.org/0000-0003-0796-5764>;
И.Б. Семенова / I.B. Semenova: <https://orcid.org/0000-0002-6630-4838>;
А.Е. Зайцев / A.E. Zaitsev: <https://orcid.org/0000-0002-8434-231x>;
Ю.В. Волох / Yu.V. Volokh: <https://orcid.org/0000-0002-5161-4964>;
А.Ю. Леонова / A.Yu. Leonova: <https://orcid.org/0000-0002-2889-2405>;
А.В. Поддубиков / A.V. Poddubikov: <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда. Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.
Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation grant. Agreement No 075-15-2021-676 dated 28.07.2021.

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.
Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 22.09.2023. Принята в печать: 26.01.2024.
Article received: 22.09.2023. Accepted for publication: 26.01.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-58-65>

Влияние твердых дисперсий с поливинилпирролидоном на растворимость ГМЛ-3

В.Б. Маркеев, С.В. Тишков, Е.В. Бlynская, К.В. Алексеев*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»; Россия, 125315 Москва, Балтийская ул., 8***Контакты:** Владимир Борисович Маркеев arzilion@yandex.ru

Введение. ГМЛ-3 обладает одновременно анксиолитическим и антидепрессивным эффектом. Однако, как и примерно 70 % разрабатываемых в качестве активных фармацевтических субстанций (АФС), ГМЛ-3 практически нерастворим в воде, что может негативно сказываться на его биодоступности. Создание твердых дисперсий (ТД) путем кристаллизации с эвтектикой или переводом АФС в аморфное состояние является одним из перспективных методов, позволяющих добиться высокой растворимости и скорости растворения АФС.

Цель исследования – изучение кристалличности и стабильности аморфных твердых дисперсий ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном (ПВП), а также высвобождения ГМЛ-3 из ТД в тесте «Растворение». В качестве объектов исследования выступали АФС ГМЛ-3, ПВП и ТД ГМЛ-3.

Материалы и методы. ТД создавали методом удаления растворителя с использованием этанола (ГМЛ-3 растворим в этаноле при соотношении 1:7) и ПВП с молекулярной массой 24–27 кДа. Кристалличность и стабильность АФС ГМЛ-3 в ТД исследовали методами дифференциально-сканирующей калориметрии и рентгенофазового анализа. Уровень высвобождения АФС ГМЛ-3 из ТД оценивали спектрофотометрически при $\lambda = 256$ нм.

Результаты. В ТД (1:5, 1:10) происходило образование очагов кристаллизации, ведущих к повторной кристаллизации АФС ГМЛ-3 во время процесса отгонки растворителя (для концентрации 1:5) или быстрой потери гомогенности ввиду образования зон повышенного содержания полимера и АФС (для концентрации 1:10). В соотношениях 1:15,20 ТД обладали высокой стабильностью (после выдерживания в течение 146,5 ч при 55 °С) и высоким уровнем высвобождения АФС ГМЛ-3 в среду воды очищенной (96 %).

Заключение. Стабильные аморфные ТД ГМЛ-3 при соотношениях АФС: полимер = 1:15,20 обеспечивают высокий уровень высвобождения ГМЛ-3 в среду воды очищенной, что позволяет сделать вывод о перспективности использования ТД ГМЛ-3 при разработке лекарственных форм (таблеток и капсул).

Ключевые слова: твердая дисперсия, растворимость, ГМЛ-3, поливинилпирролидон, кристалличность

Для цитирования: Маркеев В.Б., Тишков С.В., Бlynская Е.В., Алексеев К.В. Влияние твердых дисперсий с поливинилпирролидоном на растворимость ГМЛ-3. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):58–65. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-58-65>

Effect of solid dispersions with polyvinylpyrrolidone on the solubility of GML-3

Vladimir B. Markeev, Sergey V. Tishkov, Evgenia V. Blynskaya, Konstantin V. Alekseev*Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia***Contacts:** Vladimir Borisovich Markeev arzilion@yandex.ru

Background. GML-3 has both anxiolytic and antidepressant effects. However, like about 70 % of active pharmaceutical ingredient (API) being developed, GML-3 is practically insoluble in water, which can negatively affect bioavailability. The creation of solid dispersions (SD) by crystallization with eutectic or the transfer of API to an amorphous state is one of the promising methods that allows to achieve high solubility and dissolution rate of API.

Aim. To study the crystallinity and stability of amorphous solid dispersions of GML-3 with polyvinylpyrrolidone (PVP), as well as the release of GML-3 from SD in the Dissolution test. The objects of the study were API GML-3, PVP and SD GML-3.

Materials and methods. SD was created by the method of “solvent removal” using ethanol (GML-3 is soluble in ethanol at a ratio of 1:7) and PVP with a molecular weight of 24–27 kDa. The crystallinity and stability of GML-3 API in SD were studied by differential scanning calorimetry and X-ray phase analysis. The level of release of API GML-3 from SD was evaluated spectrophotometrically at $\lambda = 256$ nm.

Results. In SD (1:5, 1:10), crystallization foci were formed, leading to the re-crystallization of API GML-3 during the solvent distillation process (for a concentration of 1:5) or a rapid loss of homogeneity due to the formation of zones of increased polymer content and API (for a concentration of 1:10). In ratios of 1:15.20, SD had high stability (after holding for 146.5 hours at 55 °C) and a high level of release of GML-3 API into purified water (96 %).

Conclusion. Stable amorphous TD GML-3 at API: polymer ratios = 1:15.20 provide a high level of release of GML-3 into purified water, which allows us to conclude that the use of TD GML-3 is promising in the development of dosage forms (tablets and capsules).

Keywords: solid dispersion, solubility, GML-3, polyvinylpyrrolidone, crystallinity

For citation: Markeev V.B., Tishkov S.V., Blynskaya E.V., Alekseev K.V. Effect of solid dispersions with polyvinylpyrrolidone on the solubility of GML-3. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):58–65. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-58-65>

Введение

Оригинальная молекула N-бутил-N-метил-1-фенилпирроло[1,2-а]пиазин-3-карбоксамид (ГМЛ-3), синтезированная в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», обладает высоким сродством ($K_i = 5,3 \cdot 10^{-7}$ М) с митохондриальным транслокаторным белком 18 кДа [1, 2]. ГМЛ-3 проявляет выраженную антидепрессивную и анксиолитическую активность при тестировании на животных, однако его гидрофобность и кристалличность являются проблемами при разработке лекарственной формы для перорального применения [3]. Приблизительно 70 % новых разрабатываемых в качестве активных фармацевтических субстанций (АФС) молекул плохо растворимы в воде, что может негативно сказываться на их биодоступности [4, 5]. Создание твердых дисперсий (ТД) путем кристаллизации с эвтектикой или переводом АФС в аморфное состояние является одним из перспективных методов, позволяющих добиться высокой растворимости и скорости растворения АФС [6, 7]. Твердые дисперсии, в которых АФС полностью находится в аморфном состоянии, могут быть более стабильными во время хранения, а полное прекращение повторной кристаллизации позволяет добиться воспроизводимости результатов, большей скорости растворения АФС и снижения риска повторной кристаллизации в растворе с выпадением в осадок.

Цель исследования — изучение кристалличности и стабильности аморфных ТД ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном (ПВП), а также высвобождения ГМЛ-3 из ТД в тесте «Растворение».

Растворимость ГМЛ-3 в воде составляет 1 к более чем 10 000, что согласно Фармакопее Евразийского экономического союза (Фармакопее ЕАЭС) относит данное вещество к практически нерастворимым. Поскольку предполагается, что ГМЛ-3 будет использован при создании твердой лекарственной формы (таблетки, капсулы), для получения ТД выбран часто

используемый в качестве связующего в технологии влажного гранулирования повидон (ПВП) с молекулярной массой 24–27 кДа, выпускаемый под торговым названием Kollidon® 25 (BASF, Германия). Кристалличность полученных образцов исследовали методом дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК) и рентгеновской порошковой дифрактометрии. Степень высвобождения ГМЛ-3 из ТД оценивали в тесте «Растворение в среде воды очищенной». Все ТД сравнивали с исходной ГМЛ-3 и механической смесью ГМЛ-3 и ПВП.

Материалы и методы

Объект исследования — N-бутил-N-метил-1-фенилпирроло[1,2-а]пиазин-3-карбоксамид (ГМЛ-3).

При разработке ТД использовали ПВП [Kollidon® 25, BASF, Германия (USP/NF, EP, JP)] и этанол 96 %.

Технология приготовления твердых дисперсий. Исходя из высокой температуры плавления ПВП (примерно 159 °C) по сравнению с ГМЛ-3 (приблизительно 88 °C) и хорошей растворимости ГМЛ-3 в этаноле (1:7) в качестве технологии получения ТД выбрали метод удаления растворителя. ГМЛ-3 и Kollidon® 25

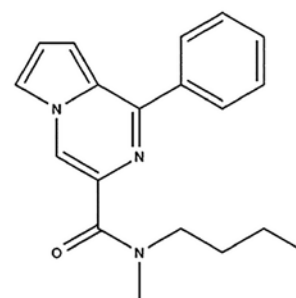


Рис. 1. Структурная формула ГМЛ-3

Fig. 1. Structural formula of GML-3

совместно растворяют в 96 % этиловом спирте с последующим удалением этанола при температуре 55–57 °C в течение 6–8 ч.

Технология получения механической смеси. Смеси ГМЛ-3 и ПВП готовили совместным измельчением в агатовой ступке в течение 10 мин в тех же пропорциях, что и при изготовлении ТД.

Изучение фазовых переходов ГМЛ-3 и твердых дисперсий ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном методом дифференциально-сканирующей калориметрии. Измерение образцов методом ДСК проводили с использованием дифференциально-сканирующего калориметра Netzsch STA 449 F1 (Netzsch, Германия), совмещенного с термогравиметрией QMS 403 C. Измерения проводили согласно требованиям общей статьи Фармакопеи ЕАЭС 2.1.2.46. Термический анализ (201020046–2022). Приблизительно 5 мг образца взвешивали и запечатывали в алюминиевую емкость с отверстием в крышке. Образцы нагревали до температуры 160 °C со скоростью нагрева 5 °C/мин. В качестве продувочного газа использовали воздух.

Измерение методом рентгенофазового анализа кристаллической структуры ГМЛ-3 и твердых дисперсий ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном. Спектры рентгенофазового анализа регистрировали с помощью настольного рентгеновского дифрактометра MiniFlex 600 Rigaku (Rigaku Corporation, Япония) согласно общей статье Фармакопеи ЕАЭС 2.1.10.5. «Определение кристалличности твердых веществ методом рентгеновской порошковой дифрактометрии». Измерения проводили на базе ЦКП ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН излучением Cu Ka при 40 кВ и 40 мА в диапазоне 2–60° со скоростью сканирования 4°/мин и размером шага 0,02°.

Испытание на растворение. Проводили согласно требованиям общей статьи Фармакопеи ЕАЭС 2.1.9.3 «Испытание на растворение твердых дозированных лекарственных форм». Среда растворения – 900 мл воды очищенной; устройство – лопастная мешалка, скорость вращения лопастей – 50 об/мин; температура среды растворения – $37,0 \pm 0,5$ °C; время отбора проб – на 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин. После каждого отбора проб проводили пополнение среды (10 мл). Оптическую плотность определяли спектрофотометрически при длине волны 256 ± 2 нм.

Испытания стабильности твердых дисперсий ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном (1:15) методом ускоренного старения. Образцы хранили в закрытых емкостях при температуре $55 \pm 0,5$ °C в течение 46 и 138,5 ч, что соответствует примерно 1 и 3 мес хранения при комнатной температуре.

Результаты и обсуждение

Исследование кристалличности методами рентгенофазового анализа и дифференциально-сканирующей

калориметрии. Согласно проведенному исследованию ГМЛ-3 в твердом состоянии представляет собой кристаллы, которые начинают плавиться при температуре 88,48 °C с эндотермическим пиком 94,01 °C и выделением 85,54 мВт/мг энергии. Для ГМЛ-3 также характерны пики дифрактограммы при 5,7; 7,5; 12,1; 17,9; 21,1 и 22,7 °C (рис. 2).

При механическом смешивании ГМЛ-3 с ПВП в соотношении 1:10 на дифрактограмме сохранились все пики высокой интенсивности, свойственные для ГМЛ-3, а снижение их интенсивности происходит за счет измельчения кристаллов и аморфного гало, создаваемого полимером (рис. 3). При создании ТД ГМЛ-3 в соотношении 1:5 кристалличность тоже наблюдается, но она менее выраженная, так как в результате сушки раствора, полученного при совместном растворении ГМЛ-3 и Kollidon® 25 в этаноле, происходит повторная кристаллизация ГМЛ-3 (рис. 4).

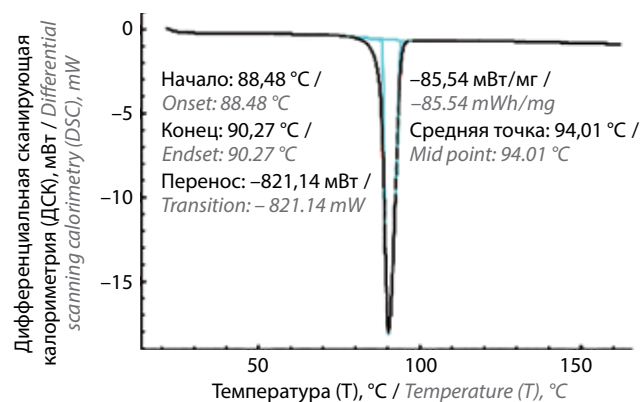


Рис. 2. Термограмма ГМЛ-3

Fig. 2. Thermogram of GML-3

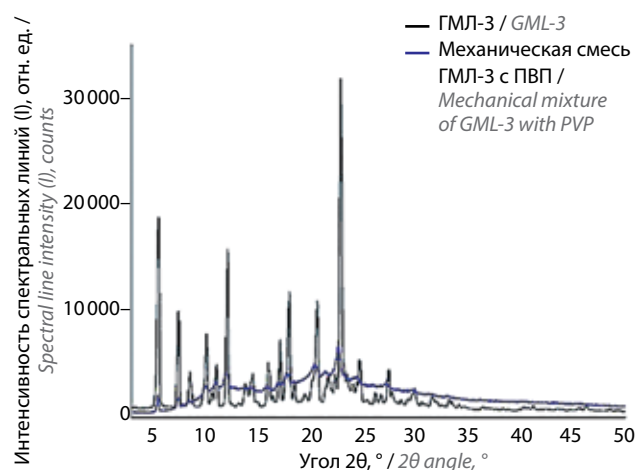


Рис. 3. Данные рентгенофазового анализа для ГМЛ-3 и механической смеси ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном (ПВП)

Fig. 3. X-ray phase analysis data for mechanical mixture of GML-3 with polyvinylpyrrolidone (PVP)

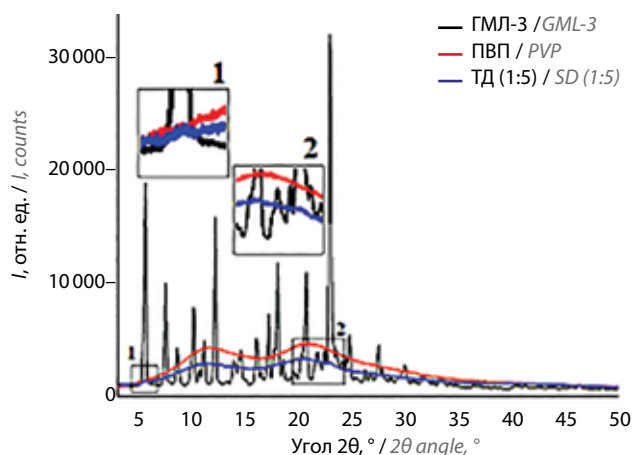


Рис. 4. Данные рентгенофазового анализа для ГМЛ-3, ПВП, твердых дисперсий (ТД) ГМЛ-3 и ПВП

Fig. 4. X-ray phase analysis data for GML-3, PVP, solid dispersions (SD) GML-3 with PVP

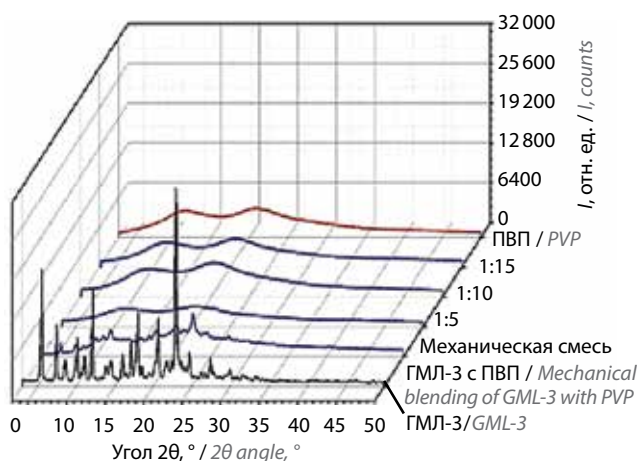


Рис. 5. Данные рентгенофазового анализа для ГМЛ-3, ПВП и ТД различной концентрации

Fig. 5. X-ray phase analysis data for GML-3, PVP, SD GML-3 with PVP at various concentrations

Другими словами, внутри образца присутствуют зоны с кристаллическим ГМЛ-3. На основании этого можно сделать вывод о том, что при соотношении ГМЛ-3 и ПВП 1:5 ГМЛ-3 находится в кристаллическом состоянии, поскольку ПВП в такой пропорции не способен ингибировать кристаллизацию в процессе сушки ТД, а при соотношениях 1:10 и более ГМЛ-3 переходит в полностью аморфное состояние (рис. 5).

При соотношении ГМЛ-3 и ПВП 1:15 наблюдали выраженное увеличение интенсивности 2-го гало, свойственного для полимера (для ПВП 2-е и 1-е гало — одинаковой интенсивности), что может свидетельствовать о слабом взаимодействии ГМЛ-3 и ПВП внутри ТД.

При многократном повторении эксперимента картина с изменением 2-го гало сохранилась, более того, наблюдали увеличение интенсивности и для соотношения компонентов 1:10. К тому же именно при таком соотношении при повторном измерении через 3 мес 2-е гало опускалось до свойственных для ПВП значений, что может свидетельствовать о нестабильности такой ТД.

Учитывая это обстоятельство, помимо обычного исследования образцов на ДСК, провели их изучение после ускоренного старения (при температуре хранения выше комнатной на 30 °С, в закрытом сосуде в течение 46 и 138,5 ч). Результаты представлены на рис. 6–8.

Непосредственно после сушки все образцы во всех исследуемых концентрациях не проявляли свойственной для кристаллов ГМЛ-3 температуры плавления.

После ускоренного старения ТД ГМЛ-3 (1:5) быстро приобрел кристалличность (рис. 6, в). Основываясь на теории Флори, можно предположить, что эндотермические процессы в ТД будут смещены (по температуре) в сторону меньших значений, т. е. от 94,01 °С в пике. Отсутствие характерного для плавления пика ГМЛ-3 обусловлено образованием ТД. Полученная ТД ведет себя на ДСК как стеклообразное вещество без признаков остаточной кристалличности. После термостатирования при температуре 55 °С в течение 46 ч произошло смещение температуры начала стеклования с 35,64 до 54,95 °С, что косвенно может свидетельствовать о появлении зон с повышенной концентрацией ПВП и ГМЛ-3 в ТД (рис. 6, б). После хранения 138,5 ч при температуре 55 °С на ДСК отчетливо наблюдается пик кристаллизации, что говорит об образовании молекулами ГМЛ-3 кристаллической решетки внутри ТД.

При соотношении 1:10 через 46 ч также произошло изменение температуры начала стеклования, однако термограмма лишена любых эндотермических скачков, свидетельствующих о плавлении, что дает основание говорить о стабильности ТД (рис. 7). Однако через 138,5 ч ТД перестала быть гомогенной, что свидетельствует об исчезновении эвтектики. Данный эффект является промежуточным перед полным возвращением ГМЛ-3 в кристаллическое состояние. При соотношении 1:15 ГМЛ-3 сохранял аморфность и проявлял достаточную стабильность (рис. 8). Таким образом, при соотношениях ГМЛ-3 и ПВП 1:5 и 1:10 достаточно быстро образуются очаги кристаллизации ГМЛ-3 или зоны повышенного содержания АФС, что позднее приводит к постепенному восстановлению кристаллической структуры ГМЛ-3. При увеличении содержания ПВП в ТД (до 1:15 и более) начало процессов, предшествующих кристаллизации АФС, не обнаружено в течение 138,5 ч ускоренного старения.

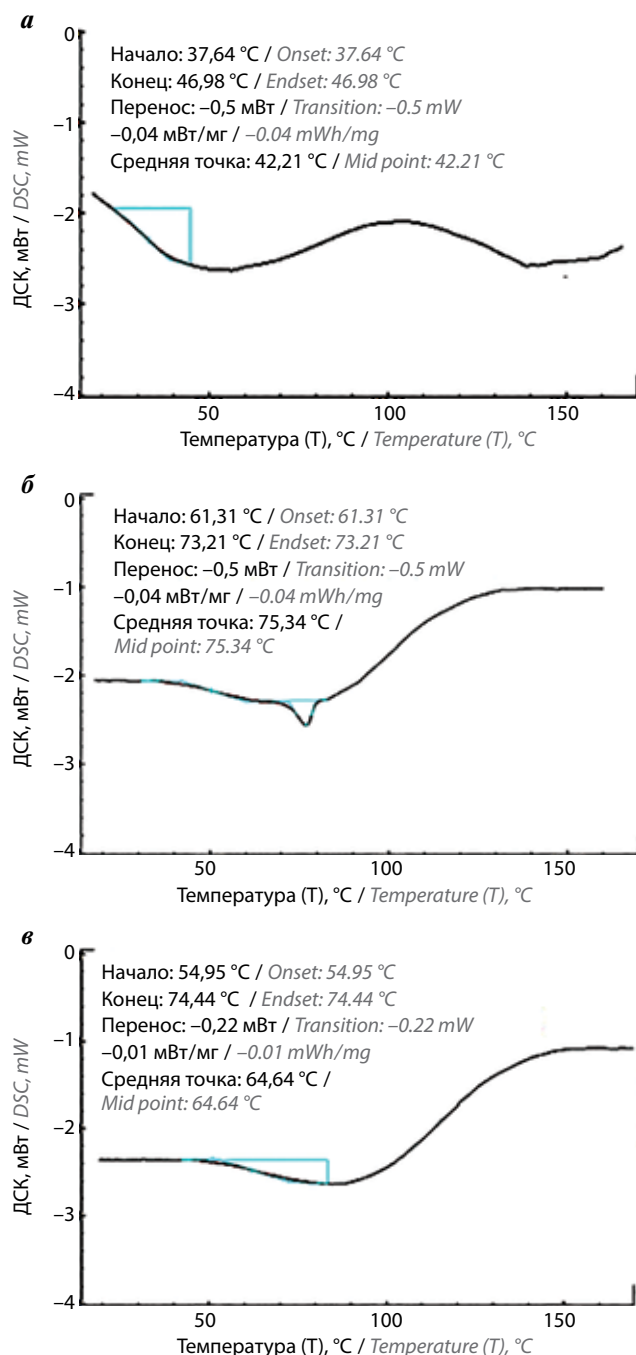


Рис. 6. Термограмма ТД ГМЛ-3 при соотношении с ГМЛ-3: полимер = 1:5 после сушки (а), через 46 (б) и 138,5 (в) ч ускоренного старения
Fig. 6. Thermogram TD GML-3 when correlated with GML-3: polymer = 1:5 after drying (a), after 46 (б) and 138.5 (в) hours of accelerated aging

Таким образом, можно говорить о стабильности полученных ТД с ПВП только при соотношении 1:15 и более.

Оценку уровня высвобождения АФС ГМЛ-3 проводили на спектрофотометре при длине волны $\lambda = 256$ нм. Согласно тесту «Растворение», проведенному с ТД, наблюдается рост уровня и скорости высвобождения

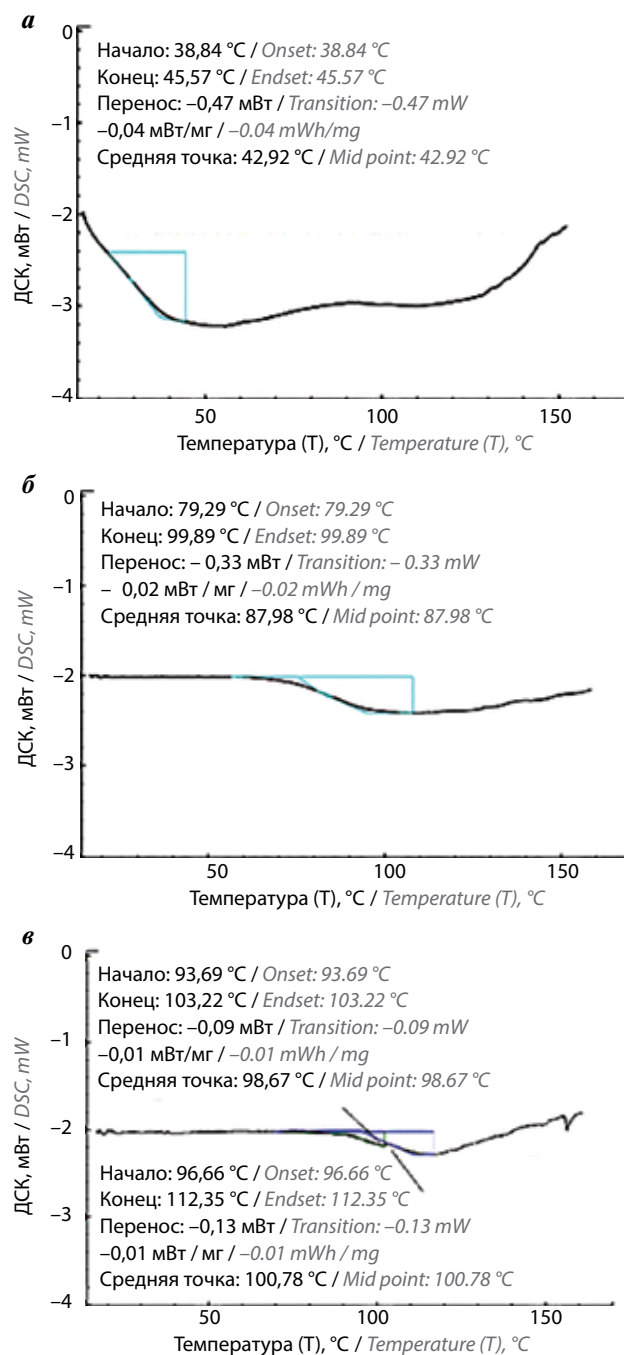


Рис. 7. Термограмма ТД ГМЛ-3 при соотношении с ГМЛ-3: полимер 1:10 после сушки (а), через 46 (б) и 138,5 (в) ч ускоренного старения
Fig. 7. Thermogram TD GML-3 when correlated with GML-3: polymer = 1:10 after drying (a), after 46 (б) and 138.5 (в) hours of accelerated aging

для ТД с ПВП по сравнению с ГМЛ-3 и механической смесью полимера с ГМЛ-3, начиная от концентрации 1:5 (рис. 9). Так, для соотношений АФС с ПВП 1:5 и 1:10 общее количество высвободившегося за 60 мин ГМЛ-3 составляло 68 и 77 % соответственно при сравнимой скорости высвобождения. При увеличении концентрации ПВП наблюдается рост высвобождения

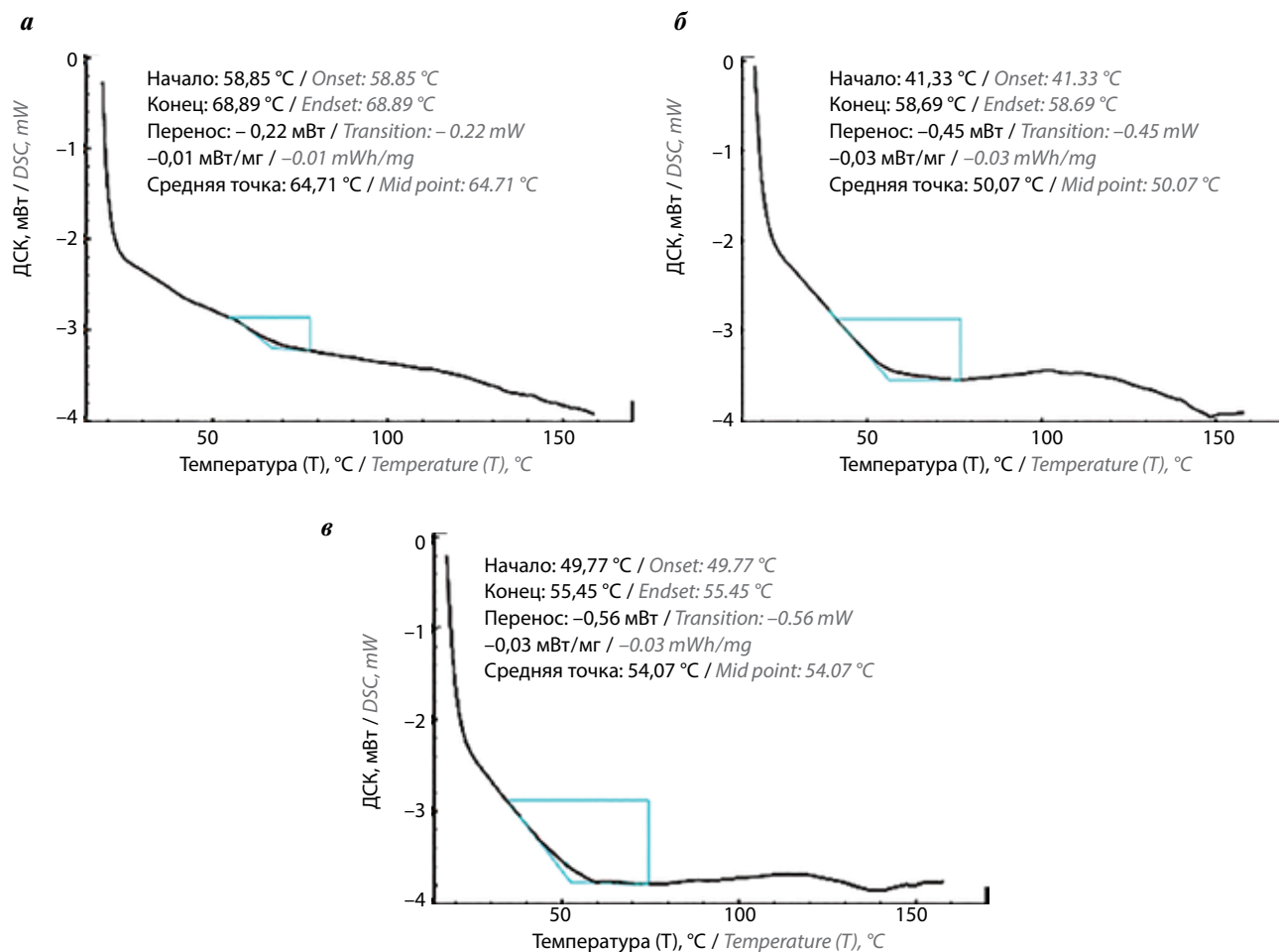


Рис. 8. Термограмма ТД ГМЛ-3 при соотношении с ГМЛ-3: полимер = 1:15 после сушки (а), через 46 (б) и 138,5 (в) ч ускоренного старения
Fig. 8. Thermogram TD GML-3 when correlated with GML-3: polymer = 1:15 after drying (a), after 46 (б) and 138.5 (в) hours of accelerated aging

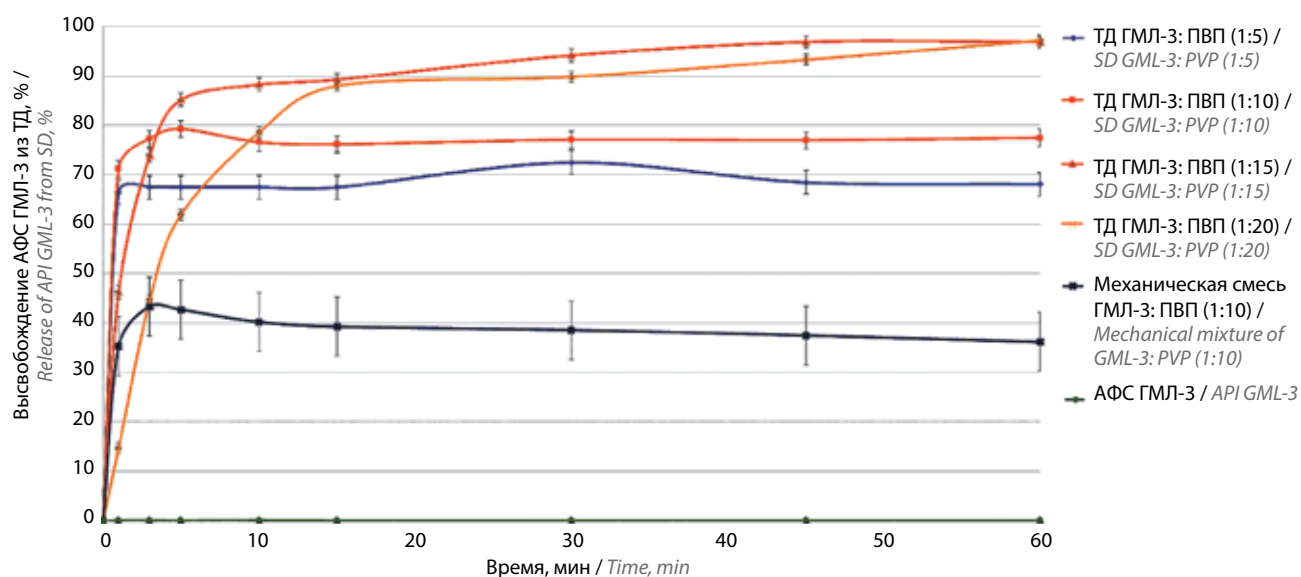


Рис. 9. Кинетика высвобождения активной фармацевтической субстанции (АФС) ГМЛ-3 из ТД в сравнении с АФС ГМЛ-3 и ее механической смесью с ПВП
Fig. 9. Kinetics of active pharmaceutical ingredient (API) GML-3 release from SD in comparison with API GML-3 and its mechanical mixture with PVP

со снижением скорости растворения. Для ТД (1:15) за 15 мин высвободилось 90 % ГМЛ-3, достигнув значения 96 % за 45 мин. Дополнительно исследованный образец с большим содержанием ПВП (1:20) не продемонстрировал увеличения общего уровня высвобождения, однако заметно снизилась скорость растворения ГМЛ-3. При повторении опыта с теми же образцами через 12 мес для ПВП наблюдали некоторое снижение уровня высвобождения для 1:5 и 1:10 (на 25–30 %), что указывает на нестабильность ТД в данных концентрациях, как ранее было продемонстрировано методом ДСК (при ускоренном старении).

Стоит отметить, что высокий уровень высвобождения ГМЛ-3 из ТД говорит о его перспективности как основы для создания пероральной лекарственной формы (таблеток, капсул), однако технология получения таблеток ГМЛ-3 на основе ТД ГМЛ-3 – ПВП требует дополнительных исследований.

Заключение

Согласно проведенному исследованию, ТД ГМЛ-3 в соотношении 1:15 к полимеру (ПВП) обладают наибольшей стабильностью (после хранения 138,5 ч при температуре 55 °С), сохраняя аморфность ГМЛ-3. Снижение концентрации полимера приводит к образованию очагов кристаллизации в течение времени ведущих к повторной кристаллизации ГМЛ-3 во время процесса отгонки растворителя (для концентрации 1:5) или быстрой потери гомогенности ввиду образования зон повышенного содержания полимера и АФС (для концентрации 1:10). Стабильные формы ТД (1:15,20) по причине своей аморфности обеспечивают высокий уровень высвобождения ГМЛ-3 в среду воды очищенной (96 %), что позволяет сделать вывод о перспективности использования ТД ГМЛ-3 при разработке лекарственных форм (таблеток и капсул).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mokrov G.V., Deeva O.A., Gudasheva T.A. et al. Design, synthesis and anxiolytic-like activity of 1-arylpyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamides. *Bioorg Med Chem* 2015;23(13): 3368–78. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.04.049
2. Yarkov S.A., Mokrov G.V., Gudasheva T.A. et al. Pharmacological study of new compounds acting as regulators of 18-kDa translocator protein ligands. *Eksp Klin Farmakol* 2016;79(1):7–11. PMID: 27159950
3. Яркова М.А., Мокров Г.В., Гудашева Т.А., Серединин С.Б. Анксиолитическое действие оригинальных производных пирроло[1,2-*a*]пиразина, лигандов TSPO, зависит от биосинтеза нейростероидов. *Химико-фармацевтический журнал* 2016;50(8):3–6. DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-8-3-6 Yarkova M.A., Mokrov G.V., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. Anxiolytic activity of original pyrrolo[1,2-*a*]pyrazine derivatives (TSPO ligands) depends on neurosteroid biosynthesis. *Pharm Chem J* 2016;50(8):3–6. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-8-3-6
4. Davis M., Walker G. Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. *J Con-trolled Release* 2018;269(10):110–27. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.11.005
5. Khan K.U., Minhas M.U., Badshah S.F. et al. Overview of nanoparticulate strategies for solubility enhancement of poorly soluble drugs. *Life Sci* 2022;291:120301. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120301
6. Bazzo G.C., Pezzini B.R., Stulzer H.K. Eutectic mixtures as an approach to enhance solubility, dissolution rate and oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm* 2020;588:119741. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119741
7. Yousaf A.M., Malik U.R., Shahzad Y. et al. Silymarin-laden PVP-PEG polymeric composite for enhanced aqueous solubility and dissolution rate: Preparation and *in vitro* characterization. *J Pharm Anal* 2019;9(1):34–9. DOI: 10.1016/j.jpha.2018.09.003

Вклад авторов

В.Б. Маркеев: написание текста рукописи, получение данных для анализа, анализ полученных данных;

С.В. Тишков: разработка дизайна исследования;

Е.В. Блынская: анализ полученных данных;

К.В. Алексеев: написание текста рукописи.

Author's contributions

V.B. Markeev: writing the text of the manuscript, obtaining data for analysis, analysis of the data obtained;

S.V. Tishkov: research design development;

E.V. Blynskaya: analysis of the received data;

K.V. Alekseev: writing the text of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.Б. Маркеев / V.B. Markeev: <https://orcid.org/0000-0003-2930-9397>

С.В. Тишков / S.V. Tishkov: <https://orcid.org/0000-0002-8321-6952>

Е.В. Бlynская / E.V. Blynskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9494-1332>

К.В. Алексеев / K.V. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0003-3542-0024>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 03.10.2023. Принята в печать: 16.01.2024.

Article received: 03.10.2023. Accepted for publication: 16.01.2024.

Тест «Растворение» для контроля качества таблеток аналога соматостатина, нерастворимого в воде

Е.В. Игнатьева¹, М.Н. Краева¹, И.В. Ярцева¹, Д.В. Подымова², О.Л. Орлова¹, Д.В. Гусев¹,
Я.А. Поскедова², Т.М. Литвинова², З.С. Шпрах^{1,2}

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

²ФГАОУ ВО «Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8

Контакты: Зоя Сергеевна Шпрах z.shprakh@ronc.ru

Введение. Одним из наиболее важных критериев качества таблеток является испытание для подтверждения высвобождения действующего вещества – тест «Растворение». Значимость данного теста определяется тем, что от высвобождения из лекарственной формы зависят скорость и степень всасывания лекарственного средства *in vivo*. Особенную сложность представляет разработка теста «Растворение» для веществ, которые плохо растворимы в воде.

Цель исследования – разработка методики теста «Растворение» для таблеток цифетрилина 60 мг и изучение высвобождения цифетрилина из таблеток.

Материалы и методы. В работе использовали оригинальный аналог соматостатина – цифетрилин, синтезированный в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Разработку теста проводили для таблеток цифетрилина 60 мг. Исследование проводили на тестере для проверки растворения Erweka серии 700 типа II – лопастной мешалке (Erweka GmbH, Германия), используя в качестве среды растворения хлористоводородную кислоту и изопропиловый спирт, а также их смесь. Количественное определение высвободившегося цифетрилина проводили на регистрирующем спектрофотометре Agilent Cary® 100 (Agilent Technologies, США).

Результаты. Выбраны оптимальные условия для определения высвобождения цифетрилина из таблеток 60 мг. Поскольку цифетрилин нерастворим в воде, в качестве среды растворения предложено использовать смесь хлористоводородной кислоты и изопропилового спирта в соотношении 3:2. Показано, что скорость вращения мешалки 100 об/мин обеспечивает переход нормированного количества цифетрилина в среду растворения за 45 мин. Разработана методика количественного определения цифетрилина в среде методом прямой спектрофотометрии. Оценка профиля растворения цифетрилина показала его постепенное высвобождение из таблеток, которое может быть описано линейной зависимостью в соответствии с уравнением Higuchi.

Заключение. В результате проведенных исследований разработана методика теста «Растворение» и оценен профиль высвобождения цифетрилина из таблеток 60 мг. Экспериментальные данные показали, что высвобождение действующего вещества из таблеток в выбранных условиях составляет более 80 % и соответствует требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания.

Ключевые слова: таблетки цифетрилина, тест «Растворение», среда растворения, количественное определение, профиль растворения

Для цитирования: Игнатьева Е.В., Краева М.Н., Ярцева И.В. и др. Тест «Растворение» для контроля качества таблеток аналога соматостатина, нерастворимого в воде. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1): 66–74. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-66-74>

Test Dissolution for quality control of water-insoluble somatostatine analog

Elena V. Ignatieva¹, Marina N. Kraeva¹, Irina V. Yartseva¹, Daria V. Podymova², Olga L. Orlova¹, Dmitriy V. Gusev¹,
Yana A. Poskedova², Tatiana M. Litvinova², Zoya S. Shprakh^{1,2}

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), Ministry of Health of Russia; 8 Trubetskaya St., Moscow 119048, Russia

Contacts: Zoya Sergeevna Shprakh z.shprakh@ronc.ru

Background. Test Dissolution, which confirms the release of the active substance, is one of the most important criteria for the quality of tablets. This test significance is determined by potential correlation between the drug absorption *in vivo* and its release from the dosage form. It is especially difficult to develop the test Dissolution for substances that are poorly soluble in water.

Aim. To develop a test Dissolution method for cyphetrylin tablets, 60 mg and to study the release of active substance.

Materials and methods. In the work we used an original analogue of somatostatin – cyphetrylin, synthesized in the laboratory of chemical synthesis of N.N. Blokhin National Medical Research Center for Oncology of the Russian Ministry of Health. The test was developed for cyphetrylin tablets, 60 mg. The study was carried out on a dissolution tester Erweka series 700 (type II – Paddle (Erweka, Germany), using hydrochloric acid and isopropyl alcohol and their mixture as a dissolution medium. Quantitative determination of released cyphetrylin was carried out on a Agilent Cary® 100 recording spectrophotometer (Agilent Technologies, USA).

Results. Optimal conditions were selected to determine the release of cyphetrylin from tablets, 60 mg. Since cyphetrylin is insoluble in water, it is proposed to use a mixture of hydrochloric acid and isopropyl alcohol in a ratio 3:2 as a dissolution medium. It was shown that a paddle rotation speed of 100 rpm provides the release of cyphetrylin normalized quantity into the dissolution medium in 45 min. A method for cyphetrylin assay in a medium by direct spectrophotometry has been developed. Evaluation of the cyphetrylin release profile showed its gradual release from the tablets, which can be described by a linear relationship in accordance with the Higuchi equation.

Conclusion. As a result of the research, a test Dissolution procedure has been developed and the release profile of cyphetrylin from tablets, 60 mg, was assessed. Experimental data showed that in the selected conditions cyphetrylin release from the tablets is more than 80 % and meets the requirements of the Russian State Pharmacopoeia XV ed.

Keywords: cyphetrylin tablets, test Dissolution, dissolution medium, assay, release profile

For citation: Ignatieva E.V., Kraeva M.N., Yartseva I.V. et al. Test Dissolution for quality control of water-insoluble somatostatine analog. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):66–74. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-66-74>

Введение

Таблетки по-прежнему остаются одной из наиболее эффективных и доступных пациентам твердых лекарственных форм (ЛФ) ввиду возможности их самостоятельного приема, стабильности, простоты обращения и транспортировки [1]. Одним из наиболее важных критериев качества таблеток является испытание для подтверждения высвобождения действующего вещества (ДВ) — тест «Растворение» [2], значимость которого определяется тем, что от высвобождения из ЛФ зависят скорость и степень всасывания лекарственного средства (ЛС). Тест «Растворение» является обязательным требованием и применяется на протяжении всего жизненного цикла лекарственного препарата (ЛП): от выбора состава ЛФ и процесса ее получения до тестирования качества ЛП от серии к серии и изучения его стабильности [3–5].

Тест «Растворение» — критический показатель качества из-за его потенциальной корреляции с клиническими характеристиками. Он широко используется для изучения биофармацевтических характеристик ЛС и позволяет прогнозировать биодоступность и фармакокинетику ЛС и его эффективность *in vivo* [6, 7].

Особенно сложную задачу представляет разработка методики теста «Растворение» для ДВ, плохо растворимых в воде. В таком случае обычно возникают трудности с выбором среды растворения приемлемого состава, который зависит от цели теста [8]. Если предполагается моделирование *in vitro* поведения такого ЛС в организме, то среда растворения должна имитировать среду желудочно-кишечного тракта и, кроме стандартных буферных растворов (рН 1,2; 4,5 и 6,8), содержать в составе поверхностно-активные вещества. Среди последних, обычно применяемых в методиках теста «Растворение», можно выделить натрия лаурилсульфат, полисорбаты (твины) 20–80, Тритон X, бридж-35, цетилтриметиламмония бромид и др. Поскольку эти вещества являются в сотни раз более сильными эмульгаторами, чем желчные кислоты, содержание поверхностно-активных веществ в среде растворения рекомендуется ограничивать [9–11].

Если тест «Растворение» разрабатывается для контроля качества и стандартизации ЛС, то используемая среда может не быть физиологически релевантной. В таком случае в качестве соразвителей для неполярных (гидрофобных) ЛС допустимо

использование органических растворителей и их смесей, например таких как 40 % изопропиловый спирт – буферный раствор pH 8,0 [12] или изопропиловый спирт – 0,01 М хлористоводородная кислота 30:70 [13].

Цифетрилин – аналог соматостатина – метиловый эфир *N*α-трет-бутилоксикарбонил-*S*-тетрагидропиранил-*L*-цистеинил-*L*-фенилаланил-*D*-триптофил-*N*ε-карбобензоксипептид-*L*-лизил-*L*-треонина, синтезированный в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [14, 15] (рис. 1).

Поскольку противоопухолевая активность цифетрилина наиболее полно проявляется при его пероральном введении, в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработана ЛФ – таблетки, содержащие 6 мг цифетрилина. Клиническое исследование I фазы показало необходимость увеличения количества ДВ в таблетке до 60 мг [16–18].

Цель исследования – разработка методики теста «Растворение» для таблеток цифетрилина 60 мг и изучение высвобождения цифетрилина из таблеток.

Материалы и методы

Исследование проводили для таблеток цифетрилина 60 мг, полученных в лаборатории разработки ЛФ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В работе использовали хлористоводородную кислоту (HCl), хч, и изопропиловый спирт, осч (оба реактива – производства «Химмед», Россия), и воду очищенную, соответствующую требованиям [4, 5].

Высвобождение цифетрилина из таблеток изучали, применяя прибор для теста «Растворение» DT-700 типа II – лопастную мешалку (Erwesa GmbH, Германия); верхнеприводную мешалку Heidolph Vibravex (Heidolph, Германия); ультразвуковую ванну Elma-sonic S10H (Elma, Германия); спектрофотометр

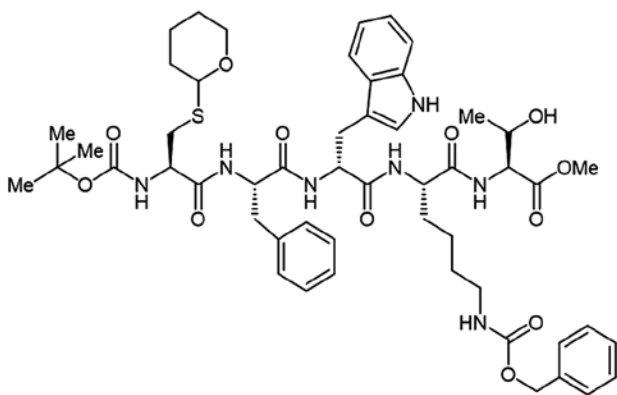


Рис. 1. Цифетрилин (*Boc-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Thr-OMe*)

Fig. 1. Cyfetriptylin (*Boc-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Thr-OMe*)

Agilent Cary® 100 (Agilent Technologies, США); pH-метр Hanna pH 211 (Hanna Instruments, Германия); весы Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия); фильтр шприцевой Filstar Syringe Filter Glass Fiber диаметром 25 мм, размером пор 1 мкм (Hawach Scientific, Китай).

Результаты и обсуждение

Тест «Растворение» предназначен для оценки степени высвобождения ДВ из ЛС и используется как одна из характеристик качества и стабильности при изучении биофармацевтических свойств ЛФ. В общем случае разработка методики теста «Растворение» включает следующее:

- изучение свойств фармацевтической субстанции и ЛС;
- выбор условий высвобождения ДВ;
- разработку методики количественного определения ДВ подходящим методом;
- оценку профиля растворения и доработку условий метода [10, 19].

Изучение свойств субстанции показало, что цифетрилин малорастворим в 95 % этиловом спирте, очень мало растворим в разбавленных минеральных кислотах и щелочах и практически нерастворим в воде [4, 5, 15]. При определении биофармацевтической растворимости установлено, что цифетрилин практически нерастворим в буферных растворах, которые имитируют основные среды желудочно-кишечного тракта – 0,1 М растворе HCl (pH 1,2), ацетатном буферном растворе (pH 4,5) и фосфатном буферном растворе (pH 6,8). Исходя из сказанного выше, мы предположили, что в качестве среды растворения таблеток цифетрилина при контроле качества необходимо использовать органический растворитель – изопропиловый спирт, разбавленную HCl или их смесь в различных соотношениях (табл. 1) [8].

Поскольку таблетки цифетрилина относятся к ЛП 1-й группы с обычным высвобождением, критерий приемлемости при проведении теста «Растворение» составляет не менее 80 % высвободившегося ДВ от заявленного содержания ($Q + 5\%$), где $Q = 75\%$, если не указано иначе в фармакопейной статье [4, 5].

Среда растворения. При выборе среды растворения предварительные исследования проводили в объеме среды 100 мл при температуре 37 °С, используя верхнеприводную лопастную мешалку со скоростью вращения 100 об/мин. Отбор пробы для определения цифетрилина, перешедшего в среду растворения, проводили через 45 мин после начала эксперимента.

Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что в растворах HCl различной концентрации таблетки распадались, но цифетрилин не высвобождался из таблеток в среду растворения (опыты 1 и 2). В изопропиловом спирте таблетки не распадались, а количество цифетрилина, перешедшего в среду

Таблица 1. Результаты исследований по выбору среды растворения
Table 1. Results of studies on the dissolution medium choice

Опыт Experiment	Состав среды растворения Composition of dissolution medium		Время отбора пробы, мин Sampling time, min	Количество высвободившегося цифетрилина, % Released cyphetrylin, %
1	0,1 М HCl 0.1 M HCl		45	0
2	0,01 М HCl 0.01 M HCl			
3	Спирт изопропиловый Isopropyl alcohol			
4*	0,01 М HCl 0.01 M HCl	10		100,0
	Спирт изопропиловый Isopropyl alcohol	90		
5*	0,01 М HCl 0.01 M HCl	30		
	Спирт изопропиловый Isopropyl alcohol	70		
6*	0,01 М HCl 0.01 M HCl	50		
	Спирт изопропиловый Isopropyl alcohol	50		
7*	0,01 М HCl 0.01 M HCl	60	45	75,0
	Спирт изопропиловый Isopropyl alcohol	40		
8*	0,01 М HCl 0.01 M HCl	70	45	10,0
	Спирт изопропиловый Isopropyl alcohol	30		
9**	0,01 М HCl 0.01 M HCl	60	45	81,5
	Спирт изопропиловый Isopropyl alcohol	40		
	0,01 М HCl 0.01 M HCl	60	90	97,3
	Спирт изопропиловый Isopropyl alcohol	40		
10**	0,01 М HCl 0.01 M HCl	70	45	18,6
	Спирт изопропиловый Isopropyl alcohol	30	90	20,8

*Таблетку помещали в 0,01 М раствор HCl, после того, как таблетка распалась (в течение 3–5 мин), прибавляли необходимое количество изопропилового спирта; **объем среды растворения – 200 мл.
*Tablet was placed in 0.01 M HCl solution, after the tablet disintegrated (within 3–5 min), the required amount of isopropyl alcohol was added;
**volume of dissolution medium was 200 ml.

растворения, было ниже предела количественного определения (опыт 3).
В следующих опытах (4–8) таблетку разрушали, помещая на несколько минут в 0,01 М раствор HCl, а затем прибавляли рассчитанное количество изопропилового спирта, постепенно его уменьшая. Как видно из табл. 1, оптимальные результаты, соответствующие критерию приемлемости при наименьшем содержании органического растворителя в среде,

получены при соотношении 0,01 М HCl и изопропилового спирта 60:40 мл (3:2 по объему) (опыт 7, pH среды 2,2). Дальнейшее уменьшение доли изопропилового спирта до соотношения 70:30 привело к резкому снижению перехода цифетрилина в среду растворения (опыт 8).
Полученные результаты подтвердили, поместив таблетку непосредственно в среду растворения без предварительного разрушения в растворе HCl.

Объем среды растворения при этом увеличили до 200 мл (опыты 9 и 10). В этих же опытах показали, что увеличение времени отбора пробы до 90 мин не оказывает существенного влияния на высвобождение цифетрилина из таблетки. Таким образом, результаты, соответствующие требованиям [4, 5], могут быть получены при использовании среды, состоящей из НСІ и изопропилового спирта в соотношении 3:2 (по объему, рН среды 2,2) и времени отбора пробы 45 мин.

Разработка методики количественного определения цифетрилина в среде растворения 0,01 М НСІ – изопропиловый спирт (3:2). Количественное определение цифетрилина, высвободившегося из таблетки в среде растворения, проводили методом прямой спектрофотометрии, используя расчет по стандартному образцу [19].

Предварительное изучение спектров поглощения раствора цифетрилина и раствора таблеток цифетрилина в выбранной среде растворения показало, что в области от 270 нм до 300 нм они практически совпадают и имеют наиболее интенсивное поглощение в максимуме при длине волны 282 ± 2 нм, которая выбрана в качестве аналитического максимума (рис. 2, а, б). Вспомогательные вещества таблетки в области аналитического максимума имеют погло-

щение менее 0,01, которое можно не учитывать при проведении анализа (рис. 2, в).

Зависимость оптической плотности от концентрации цифетрилина в среде растворения в данном максимуме линейна в диапазоне концентраций от 0,02 мг/мл до 0,2 мг/мл, а коэффициент корреляции (R^2) при этом составляет приблизительно 1,00 (рис. 3).

Для теста «Растворение» использовали аппарат II лопастную мешалку, который широко применяется для рутинного контроля качества и стандартизации твердых ЛФ с обычным высвобождением [4, 5]. Исходя из низкого удельного показателя поглощения цифетрилина ($E_{58} \pm 5$) в аналитическом максимуме [19] тестирование проводили при объеме среды растворения 500 мл.

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что при скорости вращения лопастной мешалки 100 об/мин за 45 мин из таблеток высвобождается более 80 % цифетрилина, что соответствует требованиям нормативных документов [4, 5]. Снижение скорости вращения мешалки до 50 об/мин не обеспечивает перехода необходимого количества цифетрилина в среду растворения за это время.

Далее приведены выбранные условия выполнения теста «Растворение» для таблеток цифетрилина 60 мг.

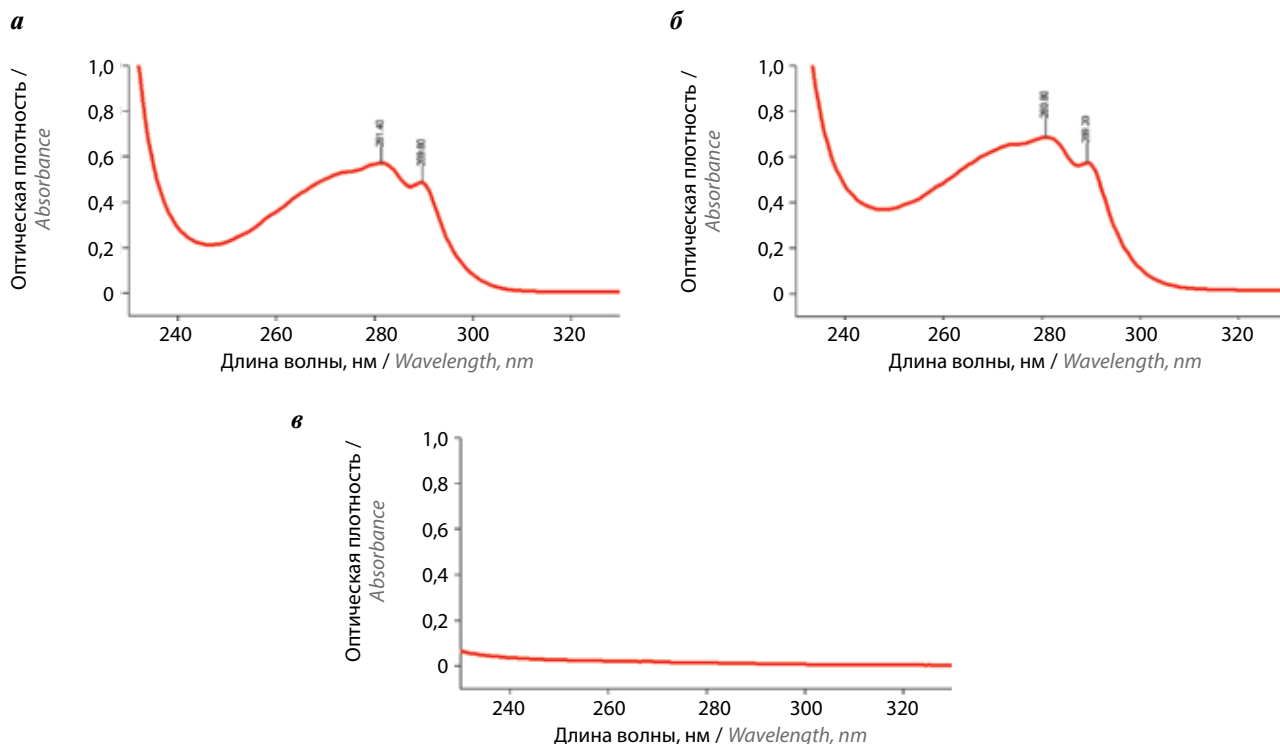


Рис. 2. Электронные спектры поглощения растворов в среде растворения: а – цифетрилина (0,1 мг/мл); б – таблеток цифетрилина; в – вспомогательных веществ

Fig. 2. Electronic absorption spectrum of solutions in the dissolution medium: а – cyphetrylin (0.1 mg/ml); б – cyphetrylin tablets; в – excipients of cyphetrylin tablets

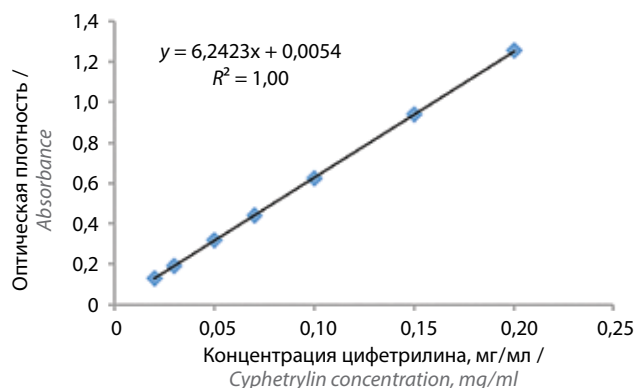


Рис. 3. График зависимости оптической плотности от концентрации цифетрилина в среде растворения

Fig. 3. Graph of the dependence of optical density on the concentration of cyphetrylin in the dissolution medium

Аппарат: аппарат II лопастная мешалка.

Среда растворения: 0,01 М НСl – изопропиловый спирт 3:2 (по объему), рН 2,2.

Объем среды растворения: 500 мл.

Температура проведения теста: $37 \pm 0,5$ °С.

Скорость вращения: 100 об/мин.

Время растворения: 45 мин.

В качестве стандартного образца использовали субстанцию цифетрилина, полученную в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [14].

Для получения раствора стандартного образца точную навеску цифетрилина примерно 6 мг растворяли в 20 мл изопропилового спирта в течение 10 мин с использованием ультразвуковой ванны. Полученный раствор количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, промывая флакон 0,01 М раствором НСl, доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали.

Для проведения теста в каждый сосуд аппарата II, содержащий 500 мл среды растворения с температурой $37 \pm 0,5$ °С, помещали по 1 таблетке цифетрилина и включали лопастную мешалку (скорость вращения – 100 об/мин). Через 45 мин отбирали 10 мл

раствора, пробу фильтровали через шприцевой фильтр, отбрасывая первые 5 мл фильтрата, и охлаждали до комнатной температуры.

Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре в максимуме при длине волны 282 ± 2 нм в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения среду растворения. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца.

Количество $C_{52}H_{69}N_7O_{12}S$ (цифетрилина), высвободившегося в среду растворения из таблетки в процентах (X , %), рассчитывали по формуле

$$X = \frac{A \times a_0 \times 500 \times 100}{A_0 \times L \times 50} = \frac{A \times a_0 \times 1000}{A_0 \times L},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца цифетрилина; a_0 – навеска стандартного образца цифетрилина, мг; L – номинальное содержание цифетрилина в таблетке, мг ($L = 60$ мг).

Как видно из данных, представленных в табл. 3, в выбранных условиях количество цифетрилина, перешедшего в среду растворения, составило примерно 84 %. Статистическая обработка полученных данных показала, что относительная погрешность среднего результата $\bar{\epsilon}$ не превышает 1,00 %.

В ходе разработки теста мы показали, что при увеличении времени отбора пробы до 90 мин выход цифетрилина в среду растворения достигает 97 % (табл. 2). Для обоснования продолжительности испытания изучили профиль растворения таблеток цифетрилина, отбирая пробы объемом 10 мл через 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 и 90 мин после начала тестирования. Объем отобранной среды растворения не восполняли, а количество цифетрилина (X , %), высвободившегося в среду растворения, рассчитывали по формуле (см. выше), учитывая изменение объема среды растворения.

Профиль высвобождения цифетрилина из таблеток, полученный с использованием усредненных экспериментальных данных (рис. 4), имеет вид кривой

Таблица 2. Результаты выбора условий теста «Растворение» для таблеток цифетрилина 60 мг

Table 2. Test Dissolution conditions for cyphetrylin tablets 60 mg

Среда растворения Dissolution medium	Скорость вращения, об/мин Paddle rotation speed, rpm	Время отбора пробы, мин Sampling time, min	Количество высвободившегося цифетрилина, % Released cyphetrylin, %
0,01 М НСl – изопропиловый спирт 3:2 0.01 M HCl – isopropyl alcohol 3:2	50	45	72,2
0,01 М НСl – изопропиловый спирт 3:2 0.01 M HCl – isopropyl alcohol 3:2	100	45	83,5
		90	96,7

Таблица 3. Результаты количественного определения высвободившегося цифетрилина в тесте «Растворение»

Table 3. Results of released cyphetrylin assay in the test Dissolution

Опыт Experiment	1	2	3	4	5	6
Оптическая плотность испытуемого раствора Absorbance of test solution	0,625	0,617	0,624	0,628	0,619	0,622
Цифетрилин, высвободившийся в среду растворения, %* Released cyphetrylin, %*	84,6	83,5	84,4	85,0	83,8	84,1
Метрологические характеристики Metrological characters						
$\bar{x}$, %	S^2	S	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$	$t(p, f)$ табл.	$\bar{e}$, %
84,2	0,2987	0,5465	0,2231	0,57	2,57	0,68

*Навеска стандартного образца — 5,519 мг.

Примечание. Оптическая плотность раствора стандартного образца $A_0 = 0,680$.

*Weight of the standard sample — 5.519 mg.

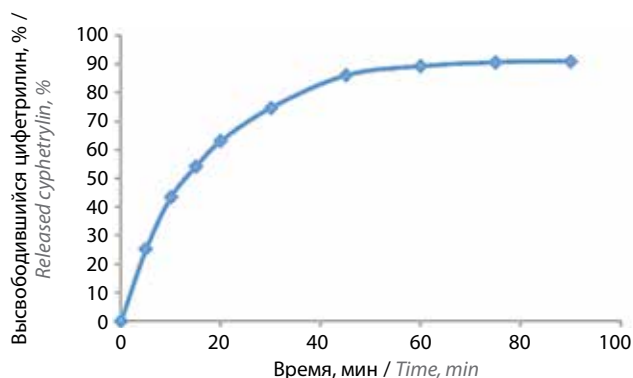
Note. Absorbance of the standard sample solution $A_0 = 0.680$.

Рис. 4. Профиль высвобождения цифетрилина из таблеток

Fig. 4. Profile of cyphetrylin release from tablets

с насыщением и выходом на плато, что характерно для распадающихся ЛФ. Цифетрилин постепенно высвобождается из таблеток, и к 30-й мин его количество в среде растворения достигает 75 %; затем скорость растворения замедляется, и через 45 мин в среду переходит приблизительно 85 % цифетрилина. Позднее количество цифетрилина в растворе практически не изменяется (выходит на плато) и на 60–90-й мин составляет примерно 90 %.

Таким образом, мы подтвердили, что 45 мин — необходимое и достаточное время для проведения теста «Растворение» для таблеток цифетрилина 60 мг: количество высвободившегося цифетрилина соответствует нормативным требованиям ($Q + 5\%$), а испытание проводится в условиях ненасыщения [4, 5].

Профиль высвобождения цифетрилина из таблеток оценивали с использованием различных мате-

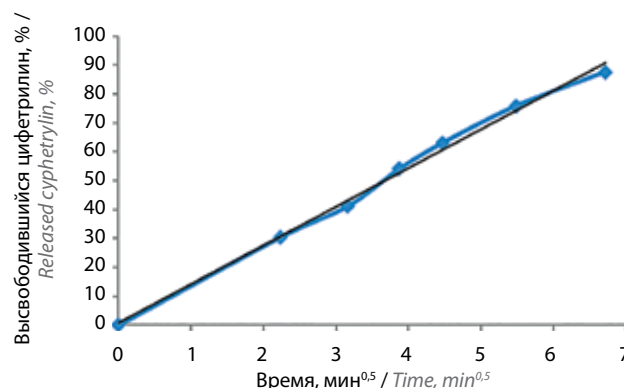


Рис. 5. Высвобождение цифетрилина из таблеток — модельная кривая по Higuchi

Fig. 5. Cyphetrylin release from tablets — model curve by Higuchi

матических моделей [20]. На рис. 5 видно, что результаты высвобождения цифетрилина из таблеток в течение 45 мин хорошо описываются линейной зависимостью, основанной на уравнении Higuchi с $R^2 > 0,99$ [20].

Заключение

В результате проведенных исследований разработана методика теста «Растворение» и оценен профиль высвобождения цифетрилина из таблеток 60 мг. Экспериментальные данные показали, что высвобождение ДВ из таблеток в выбранных условиях составляет более 80 % и соответствует требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания.

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

1. Sohail Arshad M., Zafar S., Yousef B. et al. A review of emerging technologies enabling improved solid oral dosage form manufacturing and processing. *Adv Drug Deliv Rev* 2021;178:113840. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113840
2. Abend A., Curran D., Kuiper J. et al. Dissolution testing in drug product development: workshop summary report. *AAPS J* 2019;21(2):21. DOI: 10.1208/s12248-018-0288-4
3. Chen H., Wang R., McElderry J.D. Discriminative dissolution method development through a QbD approach. *AAPS PharmSciTech* 2023;24(8):255. DOI: 10.1208/s12249-023-02692-8
4. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издание. 2023. Доступно по: <https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/10/gosudarstvennaya-farmakopeya-rossiyskoy-federatsii-xv-izdaniya>. Russian State Pharmacopoeia, XV Edition. 2023. Available at: <https://minzdrav.gov.ru/ministry/61/10/gosudarstvennaya-farmakopeya-rossiyskoy-federatsii-xv-izdaniya>. (In Russ.).
5. Фармакопея Евразийского экономического союза. 2020. Доступно по: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/bd2/Farmakopeya-2020-t1_1.pdf?ysclid=lt8ai30j5x84425722. Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union. 2020. Available at: https://eec.eaeunion.org/upload/medialibrary/bd2/Farmakopeya-2020-t1_1.pdf?ysclid=lt8ai30j5x84425722. (In Russ.).
6. Grady H., Elder D., Webster G.K. et al. Industry's view on using quality control, biorelevant, and clinically relevant dissolution tests for pharmaceutical development, registration, and commercialization. *J Pharm Sci* 2018;107(1):34–41. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.10.019
7. Suarez-Sharp S., Abend A., Hoffelder T. et al. *In vitro* dissolution profiles similarity assessment in support of drug product quality: What, how, when-workshop summary report. *AAPS J* 2020;22(4):74. DOI: 10.1208/s12248-020-00458-9
8. Gowthamarajan K.S., Singhd S. Dissolution testing for poorly soluble drugs: A Continuing perspective. *Dissolution Technologies* 2010;8:24–32. DOI: 10.14227/DT170310P24
9. Гребёнкин Д.Ю., Станишевский Я.М., Шохин И.Е. Современные подходы к проведению сравнительного теста кинетики растворения (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств 2016;1(14):166–71. Grebenkin D.Yu., Stanishevskiy Ya.M., Shohin I.E. Modern approaches of dissolution profile test (review). *Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv* = Drug development and registration 2016;1(14):166–171. (In Russ.).
10. Игнатьева Е.В., Шпрах З.С., Ярцева И.В., Санарова Е.В. Тест «Растворение» как элемент комплексной оценки качества капсул, содержащих секоизоларицирезинол. Российский биотерапевтический журнал 2019;1(18):95–100. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-95-100 Ignatieva E.V., Shprakh Z.S., Yartseva I.V., Sanarova E.V. Test “Dissolution” as an integral part of quality complex evaluation of capsules with sekoisolariciresinol. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2019;1(18):95–100. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-95-100
11. Mudie D.M., Samiei N., Marshall D.J. et al. Selection of *in vivo* predictive dissolution media using drug substance and physiological properties. *AAPS J* 2020;22(2):34. DOI: 10.1208/s12248-020-0417-8
12. Shohin I.E., Grebenkin D.Y., Stanishevskii Y.M. et al. A brief review of the FDA dissolution methods database. *Dissolution Technologies* 2016;23(3):6–10. DOI: 10.14227/DT230316P6
13. Rohrs B. Dissolution method development of poorly soluble compounds. *Dissolution Technologies* 2001;8(3):1–5. DOI: 10.14227/DT080301P6
14. Смирнова Л.И., Устинкина С.В., Орлова О.Л. и др. Средство, обладающее противоопухолевым действием. Патент РФ № 2254139С1. 20.06.2005. Smirnova L.I., Ustinkina S.V., Orlova O.L. et al. Drug with antitumor effect. RU2254139C1. 20.06.2005. (In Russ.).
15. Шпрах З.С., Ярцева И.В., Смирнова Л.И. и др. Синтез и химико-фармацевтические характеристики аналога соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью. Химико-фармацевтический журнал 2012;48(3):19–22. DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-3-19-22 Shprakh Z.S., Yartseva I.V., Smirnova L.I. et al. Synthesis and chemico-pharmaceutical characteristics of a somatostatin analog with antitumor activity. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal* = Chemical and Pharmaceutical Journal 2012;48(3):19–22. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2014-48-3-19-22
16. Шпрах З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П., Смирнова З.С. Доклиническое изучение противоопухолевой активности цифетрилина на экспериментальных опухолях животных. Экспериментальная и клиническая фармакология 2019;82(8):27–31. DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-8-27-31 Shprakh Z.S., Borisova L.M., Kiseleva M.P., Smirnova Z.S. Preclinical study of cyphetrylin antitumor efficiency on experimental animal tumors. *Eksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija* = Experimental and clinical pharmacology 2019;82(8):27–31. (In Russ.). DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-8-27-31
17. Shprakh Z.S., Orlova O.L., Oborotova N.A., Bunyatyan N.D. Formulation and evaluation of Somatostatin analogue tablets. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 2019;11(4):220–3. DOI: 10.22159/ijap.2019v11i4.32795
18. Шпрах З.С. Аналог гипоталамического гормона цифетрилин: доклиническое изучение и первый опыт клинического применения. Материалы IV Петербургского международно-го онкологического форума «Белые ночи»: тез. докл. СПб., 2018. С. 169. Shprakh Z.S. Analogue of the hypothalamic hormone cyphetrylin: preclinical study and the first experience of clinical use. Materials of the IV St. Petersburg International Oncological Forum “White Nights”: report abstract. Saint Petersburg, 2018. P. 169. (In Russ.).
19. Шпрах З.С., Игнатьева Е.В., Ярцева И.В. и др. Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в таблетках. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(3):55–61. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61 Shprakh Z.S., Ignatieva E.V., Yartseva I.V. et al. Development and validation of cyphetrylin assay in tablets. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(3):55–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61
20. Trucillo P. Drug carriers: A review on the most used mathematical models for drug release. *Processes* 2022;10(6):1094. DOI: 10.1016/j.addr.2021.11384

Вклад авторов

Е.В. Игнатьева, М.Н. Краева, Д.В. Подымова: получение и анализ экспериментальных данных, редактирование текста статьи;
И.В. Ярцева: написание текста рукописи;
О.Л. Орлова: получение таблеток цифетрилина 60 мг, редактирование текста статьи;
Д.В. Гусев: синтез цифетрилина, редактирование текста статьи;
Я.А. Поскедова: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;
Т.М. Литвинова: написание и редактирование текста статьи;
З.С. Шпрах: идея исследования, разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание и редактирование текста статьи.

Author's contributions

E.V. Ignatieva, M.N. Kraeva, D.V. Podymova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, editing of the manuscript text;
I.V. Yartseva: writing the text of the manuscript;
O.L. Orlova: preparation of cyphetrylin tablets, editing of the manuscript text;
D.V. Gusev: cyphetrulin synthesis, editing of the manuscript text;
Ya.A. Poskedova: research design development, analysis of the data obtained;
T.M. Litvinova: writing and editing of the manuscript text;
Z.S. Shprakh: research concept, research design development, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, writing and editing of the manuscript text.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.В. Игнатьева / E.V. Ignatieva: <https://orcid.org/0000-0002-9200-4492>
М.Н. Краева / M.N. Kraeva: <https://orcid.org/0000-0001-7845-1651>
И.В. Ярцева / I.V. Yartseva: <https://orcid.org/0000-0002-8818-7812>
Д.В. Подымова / D.V. Podymova: <https://orcid.org/0009-0009-9445-9106>
О.Л. Орлова / O.L. Orlova: <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>
Д.В. Гусев / D.V. Gusev: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8265>
Я.А. Поскедова / Ya.A. Poskedova: <https://orcid.org/0000-0001-7921-6354>
Т.М. Литвинова / T.M. Litvinova: <https://orcid.org/0000-0003-0820-0755>
З.С. Шпрах / Z.S. Shprakh: <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Источник финансирования. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 16.01.2024. Принята в печать: 15.02.2024.

Article received: 16.01.2024. Accepted for publication: 15.02.2024.

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. Обратную 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@onc.ru

THE PUBLICATION OF THE ARTICLE IN «ROSSIYSKY BIOTHERAPEVTICHESKY ZHURNAL»

I.I. Ivanov¹, P.P. Petrov²

¹N.N. Blokhin NMRCO; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115522, Russia;

²FSBSI "G.F. Gauze 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, при этом 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 исследований. Возможно включение обобщенных 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 таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наборот.

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 подрисочными 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 подрисочной 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. Использованные 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 — BSI)).

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:

Sriley 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.0b013e318299fd1. Михайленко Д.С., Алексеев Б.Я., Ефремов Г.Д., Каприн А.Д. Генетические особенности неветлелочного 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 Oncourolologists 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 автор 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 (См. 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 предоставлены 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 «О журнале».
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то выполнены требования документа Обеспечение слепого рецензирования.

