

**ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ НОВЫМ БЛОКАТОРОМ EGFR –
ПРОИЗВОДНЫМ ПИРИМИДИН-4(1Н)-ОНА НА НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ
АНГИОГЕНЕЗА В ОРГАНАХ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ МЕЛАНОМЫ B16/F10:
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

¹Франциянц Е. М. ORCID ID 0000-0003-3618-6890,

¹Бандовкина В. А. ORCID ID 0000-0002-2302-8271,

¹Шалашная Е. В. ORCID ID 0000-0001-7742-4918,

²Кодониди И. П. ORCID ID 0000-0003-1333-3472,

²Глушко А. А. ORCID ID 0000-0001-7465-5657,

²Чиряпкин А. С. ORCID ID 0000-0001-8207-2953,

¹Сурикова Е. И. ORCID ID 0000-0002-4318-7587,

¹Шихлярова А. И. ORCID ID 0000-0003-2943-7655,

¹Алексеев Э. К. ORCID ID 0009-0007-4982-5491,

¹Нескубина И. В. ORCID ID 0000-0002-7395-3086,

¹Петрова Ю. А. ORCID ID 0000-0002-2674-9832,

¹Качесова П. С. ORCID ID 0000-0001-6928-5014,

¹Трепитаки Л. К. ORCID ID 0000-0002-9749-2747,

¹Черярина Н. Д. ORCID ID 0000-0002-3711-8155,

¹Гусарева М. А. ORCID ID 0000-0002-9426-9662,

¹Нашемуков Т. Р. ORCID ID 0009-0008-6957-4893,

¹Токова А. Р. ORCID 0009-0007-6058-8095,

³Мамлина А. Г. ORCID ID 0009-0001-2153-535X

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, Российская Федерация, e-mail: eshalashnaya@mail.ru;

²Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пятигорск, Российская Федерация;

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Проведенные ранее пилотные исследования показали противоопухолевую активность производных пириимидин-4(1н)-она, блокаторов EGFR, в отношении меланомы B16/F10, в метастазировании которой важную роль играет активация неоангиогенеза. Цель исследования – изучение влияния нового ингибитора EGFR – натриевой соли 4-{2-[2-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-винил]-6-этил-4-оксо-5-фенил-4Н-пириимидин-1-ил}-бензсульфамида (6EPSVan-Na) на уровень VEGF-A и растворимых рецепторов sVEGFR1, sVEGFR2 в легких, подмышечных и паховых лимфоузлах мышей-самок при экспериментальной терапии меланомы B16/F10. Использовали мышей-самок C57BL/6 (n = 30) с подкожным ростом меланомы B16/F10, три группы по 10 особей: основная – внутримышечно 6EPSVan-Na (15,0 мг/кг), группа сравнения – перорально gefitinib (43,4 мг/кг), контрольная – внутримышечно вода для инъекций. Схема введения: 5 дней введения, 2 дня перерыв (2 курса). На 18-е сутки – эвтаназия. Проведено гистологическое исследование лимфоузлов, легких. Методом ИФА в гомогенатах тканей легких, подмышечных и паховых лимфоузлов определяли содержание VEGF-A, sVEGFR1, sVEGFR2. В контрольной группе выявлено метастазирование в легкие, подмышечные и паховые лимфоузлы. Содержание VEGF-A и sVEGFR1 в этих тканях возросло относительно показателей интактных мышей ($p \leq 0,05$ – $p \leq 0,001$); уровень sVEGFR2 в подмышечных лимфоузлах снизился в 1,7 раза, в паховых лимфоузлах и легких увеличился в 1,5 и 2,8 раза. 6EPSVan-Na ингибировал метастазирование в легкие (подобно gefitinibu) и снижал частоту синхронного поражения лимфоузлов (в отличие от gefitiniba). Введение 6EPSVan-Na и gefitiniba снижало содержание VEGF-A в легких в среднем в 2,5 раза относительно контроля. В подмышечных лимфоузлах применение 6EPSVan-Na уменьшало содержание VEGF-A в 2,1 раза, а введение gefitiniba – снижало уровень sVEGFR1 в 2,2 раза и повышало sVEGFR2 в 1,9 раза. В паховых лимфоузлах препараты снижали содержание sVEGFR1 в среднем в 2,0 раза, но после

применения гефитиниба происходило нарастание уровня VEGF-A в 1,9 раза. Введение 6EPSVan-Na ассоциировалось со снижением частоты визуально выявляемых макрометастазов, морфологическими изменениями и более выраженным антиангиогенным влиянием.

Ключевые слова: производное пиримидин-4(1H)-она, ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста, меланома, легкое, лимфоузлы, сосудистый эндотелиальный фактор роста, растворимая форма рецептора сосудистого эндотелиального фактора роста, метастазирование.

THE EFFECT OF EXPERIMENTAL THERAPY WITH A NOVEL EGFR BLOCKER – A PYRIMIDINE-4(1H)-ONE DERIVATIVE – ON SOME ANGIOGENESIS FACTORS IN THE ORGANS OF B16/F10 MELANOMA METASTASIS

¹Frantsiyants E. M. ORCID ID 0000-0003-3618-6890,

¹Bandovkina V. A. ORCID ID 0000-0002-2302-8271,

¹Shalashnaya E. V. ORCID ID 0000-0001-7742-4918,

²Kodonidi I. P. ORCID ID 0000-0003-1333-3472,

²Glushko A. A. ORCID ID 0000-0001-7465-5657,

²Chiryapkin A. S. ORCID ID 0000-0001-8207-2953,

¹Surikova E. I. ORCID ID 0000-0002-4318-7587,

¹Shikhlyarova A. I. ORCID ID 0000-0003-2943-7655,

¹Alekseev E. K. ORCID ID 0009-0007-4982-5491,

¹Neskubina I. V. ORCID ID 0000-0002-7395-3086,

¹Petrova Yu. A. ORCID ID 0000-0002-2674-9832,

¹Kachesova P. S. ORCID ID 0000-0001-6928-5014,

¹Trepitaki L. K. ORCID ID 0000-0002-9749-2747,

¹Cheryarina N. D. ORCID ID 0000-0002-3711-8155,

¹Gusareva M. A. ORCID ID 0000-0002-9426-9662,

¹Nashemukov T. R. ORCID ID 0009-0008-6957-4893,

¹Tokova A. R. ORCID ID 0009-0007-6058-8095,

³Mamlina A. G. ORCID ID 0009-0001-2153-535X

¹Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Center for Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russian Federation, e-mail: eshalashnaya@mail.ru;

²Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Volgograd State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Pyatigorsk, Russian Federation;

³Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Rostov State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russian Federation

Previous pilot studies have demonstrated the antitumor activity of pyrimidine-4(1H)-one derivatives, which are EGFR blockers, against B16/F10 melanoma, in the metastasis of which neovascularization activation plays an important role. Objective. To study the effect of a novel EGFR inhibitor – the sodium salt of 4-{2-[2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-vinyl]-6-ethyl-4-oxo-5-phenyl-4H-pyrimidin-1-yl}-benzenesulfonamide (6EPSVan-Na) – on the levels of VEGF-A and soluble receptors sVEGFR1, sVEGFR2 in the lungs, axillary and inguinal lymph nodes of female mice during experimental therapy of B16/F10 melanoma. Female C57BL/6 mice (n = 30) with subcutaneous B16/F10 melanoma growth were used, divided into three groups of 10 animals each: the main group – intramuscular administration of 6EPSVan-Na (15.0 mg/kg), the comparison group – oral administration of gefitinib (43.4 mg/kg), and the control group – intramuscular administration of water for injection. The administration schedule: 5 days of administration, 2 days of break (2 cycles). On day 18 – euthanasia. A histological examination of the lymph nodes and lungs was performed. The levels of VEGF-A, sVEGFR1, and sVEGFR2 in tissue homogenates of the lungs, axillary, and inguinal lymph nodes were determined using ELISA. Metastasis to the lungs, axillary, and inguinal lymph nodes was detected in the control group. The levels of VEGF-A and sVEGFR1 in these tissues increased relative to those in intact mice ($p \leq 0.05$ – $p \leq 0.001$); the level of sVEGFR2 decreased by 1.7 times in the axillary lymph nodes, while increasing by 1.5 times in the inguinal lymph nodes and by 2.8 times in the lungs. 6EPSVan-Na inhibited lung metastasis (similar to gefitinib) and reduced the incidence of synchronous lymph node involvement (unlike gefitinib). Administration of 6EPSVan-Na and gefitinib reduced VEGF-A levels in the lungs by an average of 2.5 times compared to the control. In the axillary lymph nodes, administration of 6EPSVan-Na reduced VEGF-A levels by 2.1 times, while gefitinib administration reduced sVEGFR1 levels by 2.2 times and increased sVEGFR2 levels by 1.9 times. In the inguinal lymph nodes, both drugs

reduced sVEGFR1 levels by an average of 2.0 times; however, after gefitinib administration, VEGF-A levels increased by 1.9 times. The administration of 6EPSVan-Na was associated with a decrease in the frequency of visually detectable macrometastases, morphological changes, and a more pronounced anti-angiogenic effect.

Keywords: pyrimidine-4(1H)-one derivative, epidermal growth factor receptor inhibitors, melanoma, lung, lymph nodes, vascular endothelial growth factor, soluble form of vascular endothelial growth factor receptor, metastasis

Введение

Меланома кожи представляет собой гетерогенное злокачественное новообразование с высокой частотой метастазирования и неблагоприятным прогнозом на поздних стадиях. Чаще всего метастазы возникают в отдаленных участках кожи и лимфатических узлах, реже – в легких, печени, головном мозге и других органах [1]. Важную роль в инвазии и метастазировании меланомы играет неоваскуляризация, индуцированная фактором роста эндотелия сосудов А (VEGF-A). Обширный ангиогенез и васкулогенная мимикрия способствуют быстрому прогрессированию заболевания [2]. Факторы роста эндотелия сосудов запускают сигнальные пути, опосредующие ангио- и лимфангиогенез, через активацию соответствующих трансмембранных рецепторов – VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, а дисрегуляция в оси VEGF/VEGFR играет значительную роль в прогрессировании меланомы и формировании лекарственной устойчивости [3].

Одним из наиболее успешных методов лечения метастатической меланомы является таргетная терапия, направленная на активирующие мутации генов. В зависимости от мутационного статуса меланоме кожи подразделяют на четыре молекулярных подтипа: с мутациями BRAF, NRAS, NF1 и с тройным диким типом (Triple-WT) [4]. При наличии мутации в гене BRAF, на долю которой приходится 50 % случаев меланомы кожи, сочетание ингибиторов BRAF/MEK и блокаторов иммунных контрольных точек позволило увеличить общую выживаемость пациентов [5]. В то же время при меланоме других молекулярных подтипов по-прежнему остается актуальным поиск мишеней для таргетной терапии и разработка новых стратегий лечения. Пути MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа) и PI3K/AKT (фосфатидилинозитол-3-киназа и протеинкиназа В) играют ключевую роль в прогрессировании и метастазировании меланомы и регулируются рецепторными тирозинкиназами, в том числе рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) [6]. Исследования *in vitro* и *in silico* на клеточных линиях меланомы человека и экспериментальных моделях меланомы на мышах показали, что рецептор эпидермального фактора роста является перспективной терапевтической мишенью [7]. Около 89 % первичных меланом кожи и 91 % метастазов меланомы демонстрируют высокий уровень экспрессии EGFR. Повышенную экспрессию данного рецептора связывают с ухудшением общей выживаемости при меланоме кожи, а также с развитием резистентности к ингибиторам BRAF/MEK [6, 8]. Кроме того, активация EGFR при прогрессировании меланомы не только приводит к стимуляции различных сигнальных путей, но также способствует переключению клеток на инвазивный

фенотип, связанный с потерей Е-кадгерина. В связи с этим препараты, блокирующие активность EGFR, предлагают использовать в качестве антиметастатических средств [9].

В Пятигорском медико-фармацевтическом институте на основании проведенного молекулярного конструирования был осуществлен синтез новых отечественных субстанций – производных пиримидин-4(1H)-она, блокаторов внутреннего домена EGFR. В исследованиях *in silico* была подтверждена их афинность к каталитическому сайту киназного домена EGFR, аналогично применяемому в онкологии ингибитору EGFR гефитинибу (производному 4-анилинохиназолина), который был использован в качестве функционального аналога. Проведенные в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России пилотные исследования показали противоопухолевую эффективность натриевой соли 4-{2-[2-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-винил]-6-этил-4-оксо-5-фенил-4H-пиримидин-1-ил}-бензсульфамида (6EPSVan-Na) на сингенной модели меланомы B16/F10 [10]. Данная модель характеризуется агрессивной кинетикой: ранним выходом опухоли и метастазированием в легкие и сигнальные лимфоузлы, а также активным ангиогенезом [11, 12]. Учитывая взаимосвязь EGFR- и VEGFR-сигналинга в регуляции ангиогенеза [13], представляется целесообразным исследовать влияние введения нового блокатора EGFR – 6EPSVan-Na на некоторые параметры ангиогенеза в органах метастазирования меланомы B16/F10.

Цель исследования – изучение влияния нового ингибитора EGFR – 6EPSVan-Na на уровень VEGF-A и растворимых рецепторов sVEGFR1, sVEGFR2 в легких, подмышечных и паховых лимфоузлах самок мышей при экспериментальной терапии меланомы B16/F10.

Материал и методы исследования

Исследование выполнено на 40 самках мышей линии C57BL/6, массой 25–28 г, которые были получены из филиала «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России» (Московская область). Содержание лабораторных животных осуществлялось в стандартных условиях вивария (естественное освещение, свободный доступ к пище и воде). Проведение эксперимента соответствовало требованиям Директивы 2010/63/ЕС «О защите животных, используемых для научных целей» и «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных». Исследование одобрено Комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (протокол № 1/229 от 21.04.2025).

Были сформированы 4 группы по 10 мышей в каждой, рандомизированные по массе тела, значимых различий средней массы между группами не было (t-тест Стьюдента): основная группа – введение 6EPSVan-Na, отрицательный контроль терапии – введение воды для инъекций; положительный контроль терапии – введение гефитиниба (референтный препарат), интактная группа – без воздействий (без перевивки опухоли и введения веществ).

Мышам трех групп с введениями трансплантировали подкожно в подлопаточную область справа жизнеспособные опухолевые клетки меланомы B16/F10 (штамм получен из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России) в объеме 6×10^5 клеток (по 0,3 мл суспензии, приготовленной в 0,9 % растворе натрия хлорида на одно животное). Гефитиниб и 6EPSTan-Na применяли в виде водных растворов, приготовленных *ex tempore*, и вводили по 0,1 мл на мыш: гефитиниб перорально через зонд в дозе 43,4 мг/кг массы животного (исходя из пересчета стандартной дозы гефитиниба для человека на мыш); 6EPSTan-Na внутримышечно в дозе 15,0 мг/кг массы животного. Строение, методы синтеза и физико-химические свойства 6EPSTan-Na представлены в работе [10]. Мыши из группы отрицательного контроля внутримышечно получали по 0,1 мл воды для инъекций. Введение веществ и воды начинали в день перевивки опухоли, что моделирует раннее профилактически-терапевтическое экспериментальное воздействие. Вещества (в группах с экспериментальным воздействием) и воду (в группе отрицательного контроля) вводили утром по следующей схеме: 5 дней ежедневного введения затем перерыв 2 дня, цикл повторяли дважды. Эвтаназию всех животных осуществляли на 18-е сутки эксперимента.

В ходе эксперимента фиксировали время выхода опухоли и ее объем (измерения проводили дважды в неделю). На дальнейших этапах применено простое ослепление. На этапе некропсии визуально оценивали наличие макрометастазов в легких и лимфатических узлах – подмышечных и паховых (критериями метастатического поражения лимфоузлов служили измененная пигментация и увеличение их объема). Гистологическое исследование легких и лимфоузлов проводили с использованием стандартных методов (фиксация образцов в 10 % формалине, заливка в парафиновые блоки, окраска срезов толщиной 5–7 мкм гематоксилином и эозином). Микроскопию препаратов осуществляли на микроскопе Leica DMLS2 с цифровой камерой OLYMPUS Camedia C-5050. В 10 % гомогенатах тканей легких, подмышечных и паховых лимфоузлов методом ИФА определяли содержание VEGF-A, sVEGFR1 и sVEGFR2. Использовали стандартные наборы компании Cusabio (Китай). Значения показателей в тканях легких, подмышечных и паховых лимфоузлов мышей интактной группы принимали за норму.

Статистический анализ данных выполнялся с применением пакета статистических программ для медицинских исследований. Нормальность распределения определяли с использованием критерия Шапиро – Уилка. В таблице результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Значимость различий долей оценивали точным критерием Фишера, различий содержания VEGF-A, sVEGFR1, sVEGFR2 – U-критерием Манна – Уитни или t-тестом Стьюдента в зависимости от вида распределения. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Исследование было одобрено Комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (протокол № 1/229 от 21.04.2025).

Результаты исследования и их обсуждение

На момент эвтаназии опухоль определялась у всех экспериментальных животных. По результатам некропсии у всех (100 %) мышей с меланомой B16/F10 в группе отрицательного контроля терапии, не получавших лечение, выявлено метастатическое поражение подмышечных и паховых лимфатических узлов, проявившееся увеличением их размеров и изменением окраски (серый или черный цвет), а также наличием точечных метастазов в отдельных лимфоузлах. Гистологическое исследование показало наличие тотального метастатического поражения лимфоузлов клетками меланомы, значительным нарушением архитектоники лимфоузлов. У 8 мышей (80 %) обнаружены макрометастазы в легких (единичные в обоих легких или множественные точечные во всех долях обоих легких). При гистологическом изучении крупного метастаза отмечалось кровенаполнение ткани легкого, сдавление просветов дыхательных путей, деструкция альвеолярных перегородок, укрупнение краевых альвеол, замещение паренхимы легкого тканью меланомы. При этом во всех исследованных тканях органов метастазирования мышей контрольной группы содержание VEGF-A и sVEGFR1 превышало значения соответствующих показателей группы интактных животных: в подмышечных лимфоузлах – в 3,1 и 4,7 раза, в паховых лимфоузлах – в 2,3 и 5,5 раза (табл. 2), в легких – в 1,5 и 1,4 раза (табл. 1). По сравнению с интактной группой уровень sVEGFR2 оказался пониженным в подмышечных лимфоузлах в 1,7 раза (табл. 2) и, напротив, повышенным в паховых лимфоузлах и легких – в 1,5 и 2,8 раза соответственно (табл. 1, 2).

Таблица 1

Содержание VEGF-A, sVEGFR1 и sVEGFR2 в тканях легких
при экспериментальном воздействии на меланому B16/F10 6EPSVan-Na и гефитинибом

Группы	VEGF-A пг/г ткани	sVEGFR1 пг/г ткани	sVEGFR2 пг/г ткани
Легкие			
Интактная	2916,5 ± 238,6	751,5 ± 63,9	127,4 ± 8,7
Отрицательный контроль терапии	4250,0 ± 352,5 p ¹ = 0,0048	1081,0 ± 108,2 p ¹ = 0,0147	359,3 ± 33,8 p ¹ < 0,0001
Положительный контроль терапии	1495,0 ± 149,0 p ¹ < 0,0001 p ² < 0,0001	886,5 ± 78,7	309,2 ± 28,5 p ¹ < 0,0001
Основная	1938,3 ± 160,6	701,0 ± 65,4	153,8 ± 15,0

Группа	$p^1 = 0,0035$ $p^2 < 0,0001$	$p^2 = 0,0075$	$p^2 < 0,0001$
--------	----------------------------------	----------------	----------------

Примечание: составлена авторами на основе полученных данных в ходе исследования. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка ($M \pm m$). Статистически значимые различия: p^1 – по сравнению с показателем в группе интактных мышей, p^2 – по сравнению с показателем в контрольной группе. Критический уровень значимости $p = 0,05$. При множественных сравнениях (VEGF-A) критический уровень значимости $p = 0,017$ (поправка Бонферрони)

Таблица 2

Содержание VEGF-A, sVEGFR1 и sVEGFR2 в тканях подмышечных и паховых лимфоузлов при экспериментальном воздействии на меланому B16/F10 6EPSVan-Na и гефитинибом

Группы	VEGF-A пг/г ткани	sVEGFR1 пг/г ткани	sVEGFR2 пг/г ткани
Подмышечные лимфоузлы			
Интактная	$133,2 \pm 9,4$	$75,1 \pm 8,4$	$53,3 \pm 6,5$
Отрицательный контроль терапии	$415,5 \pm 44,2$ $p^1 < 0,0001$	$355,3 \pm 40,1$ $p^1 < 0,0001$	$30,8 \pm 3,0$ $p^1 = 0,0055$
Положительный контроль терапии	$404,3 \pm 42,9$ $p^1 < 0,0001$	$161,0 \pm 17,4$ $p^1 = 0,0003$ $p^2 = 0,0003$	$57,7 \pm 5,5$ $p^2 = 0,0004$
Основная Группа	$194,1 \pm 21,2$ $p^1 = 0,0172$ $p^2 = 0,0002$	$385,1 \pm 43,5$ $p^1 < 0,0001$	$30,7 \pm 3,3$ $p^1 = 0,0061$
Паховые лимфоузлы			
Интактная	$63,4 \pm 5,6$	$62,0 \pm 7,7$	$49,0 \pm 5,2$
Отрицательный контроль терапии	$147,1 \pm 16,4$ $p^1 = 0,0001$	$337,8 \pm 39,0$ $p^1 < 0,0001$	$73,1 \pm 8,4$ $p^1 = 0,0250$
Положительный контроль терапии	$286,1 \pm 30,4$ $p^1 < 0,0001$ $p^2 = 0,0007$	$154,1 \pm 17,5$ $p^1 = 0,0001$ $p^2 = 0,0004$	$76,1 \pm 8,2$ $p^1 = 0,0121$
Основная Группа	$192,1 \pm 18,0$ $p^1 < 0,0001$	$190,5 \pm 17,9$ $p^1 < 0,0001$ $p^2 = 0,0029$	$109,8 \pm 10,8$ $p^1 < 0,0001$ $p^2 = 0,0150$

Примечание: составлена авторами на основе полученных данных в ходе исследования. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка ($M \pm m$). Статистически значимые различия: p^1 – по сравнению с показателем в группе интактных

мышей, p^2 – по сравнению с показателем в контрольной группе. Критический уровень значимости $p = 0,05$. При множественных сравнениях (VEGF-A, sVEGFR1) критический уровень значимости $p = 0,017$ (поправка Бонферрони)

После воздействия гефитинибом (положительный контроль терапии) метастатическое поражение подмышечных лимфоузлов отмечено у 6 (60 %) мышей группы сравнения ($p = 0,0867$ по сравнению с отрицательным контролем), паховых лимфоузлов – у 10 (100 %) мышей, одновременное поражение лимфоузлов обеих анатомических зон – у 6 (60 %) животных ($p = 0,0867$ по сравнению с отрицательным контролем). В то же время микрокартина лимфоузлов с метастатическим ростом опухоли демонстрировала характерные для апоптоза признаки гибели клеток меланомы – фрагментация ядра, конденсирование и распыление хроматина, апоптотические тельца. Только у 1 (10 %) мыши выявлено метастатическое поражение левого легкого ($p = 0,0073$ по сравнению с отрицательным контролем). Гистологическое исследование показало несколько небольших очагов метастатического роста меланомы с сохранением фенотипических черт, фигур патологического митоза, что свидетельствует о пролиферативной активности клеток опухоли. Однако на значительных участках легкого наблюдалась картина гибели опухолевых клеток аналогично микрокартине в лимфоузлах. При этом содержание VEGF-A в подмышечных лимфоузлах не отличалось от величин в группе отрицательного контроля, в паховых – возросло в 1,9 раза (табл. 2), а в легких снизилось в 2,8 раза (табл. 1). Также зафиксировано снижение уровня sVEGFR1 в 2,2 раза и в подмышечных, и в паховых лимфоузлах относительно значений в группе отрицательного контроля (табл. 2); в легких изменений показателя не выявлено. Изменение содержания sVEGFR2 – увеличение в 1,9 раза отмечено только в подмышечных лимфоузлах по сравнению с группой отрицательного контроля (табл. 2).

После терапии 6EPSVan-Na (основная группа) у 4 (40 %) мышей основной группы ($p = 0,0108$ по сравнению с группой отрицательного контроля) наблюдалось метастатическое поражение подмышечных лимфоузлов, у 7 (70 %) мышей ($p = 0,2105$ по сравнению с группой отрицательного контроля) выявлено поражение паховых лимфоузлов и только у 3 (30 %) мышей ($p = 0,0031$ по сравнению с группой отрицательного контроля) зафиксировано поражение лимфоузлов обеих анатомических зон. Гистологическое исследование показало, что в корковом слое и мягкотных тяжах лимфоузлов, пораженных опухолью, сохранялись небольшие участки скопления опухолевых клеток с признаками деструктивных изменений ядра и цитоплазмы, активацией соединительнотканых элементов, формированием комплексов лимфоцитов и плазмоцитов. Это позволяет предположить, что гибель опухолевых клеток опосредована другим механизмом – мобилизацией клеточных и тканевых элементов защиты. Макрометастазы в легких животных основной группы не обнаружены, а

микрокартина отдельных участков легких демонстрировала группы дистрофически измененных опухолевых клеток с гипохромными ядрами и замещением соединительной тканью. Участков с конгломерациями активно пролиферирующих клеток меланомы не обнаружено. Подобные результаты терапевтического воздействия 6EPSTan-Na сопровождались уменьшением содержания VEGF-A в подмышечных лимфоузлах и легких – в 2,1 и 2,2 раза соответственно (табл. 1, 2), а также снижением уровней sVEGFR1 в паховых лимфоузлах и легких – в 1,8 и 1,5 раза соответственно по сравнению со значениями показателей в группе отрицательного контроля (табл. 1, 2). Содержание sVEGFR2 возросло в паховых лимфоузлах в 1,5 раза (табл. 2), но снизилось в легких в 2,3 раза (табл. 1) относительно величин в группе отрицательного контроля.

Метастазирование является отличительной чертой злокачественных опухолей и служит причиной наибольшего числа смертей от онкологических заболеваний. Каскад метастазирования состоит из нескольких фаз и включает локальную инвазию и интравазацию опухолевых клеток в проксимальные кровеносные сосуды или лимфатические протоки, выживание в кровотоке, экстравазацию в отдаленных органах с последующей их колонизацией [14]. Формирование метастатической ниши – благоприятного микроокружения опухоли в отдаленном метастатическом органе, является необходимым условием для закрепления опухолевых клеток в отдаленных органах и ускорения метастазирования [15]. Первичные опухоли и активированные CCR2⁺ воспалительные моноциты стимулируют экстравазацию в местах метастазирования, в том числе в легких, за счет продукции факторов проницаемости сосудов, важнейшим из которых является VEGF-A [16, 17]. Стимулирующее действие VEGF-A на сосудистую проницаемость реализуется через активацию на поверхности эндотелиальных клеток трансмембранных рецепторов VEGFR1 и VEGFR2, обеспечивающих фосфорилирование VE-кадгерина, что вызывает разрушение адгезионных и плотных межклеточных контактов [2]. После проникновения диссеминированных опухолевых клеток VEGF-A, продуцируемый опухолевыми клетками и эндотелиальными клетками предшественников костного мозга, способствует колонизации дистальных органов путем активации неоангиогенеза и создания иммуносупрессивной микросреды. Кроме того, VEGF-A запускает фенотипический переход опухолевых клеток из состояния покоя в пролиферативное состояние, тем самым способствуя метастатическому росту [18].

Важную роль в прогрессировании меланомы также играет растворимая форма рецептора фактора роста эндотелия сосудов типа 1 (sVEGFR1) [19]. Растворимые формы рецепторов VEGF-A – sVEGFR1 и sVEGFR2, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга, как правило, относят к антиангиогенным факторам. Они выполняют роль

рецепторов-ловушек, регулируя распределение VEGF-A и ограничивая активацию трансмембранных рецепторов, ослабляя тем самым проангиогенную передачу сигналов [20]. Однако sVEGFR1 также оказывает проангиогенное и проопухолевое действие за счет активации интегрина $\beta 1$, что приводит к стимуляции адгезии и хемотаксиса эндотелиальных и опухолевых клеток [21].

В проведенном исследовании установлено, что метастазирование меланомы B16/F10 в легкие, подкожные и паховые лимфоузлы мышей (группа отрицательного контроля терапии) сопровождалось накоплением проангиогенных факторов VEGF-A и sVEGFR1 в этих органах. При этом более выраженное увеличение показателей, особенно sVEGFR1, отмечено в лимфоузлах. На дисбаланс в органах метастазирования оси VEGF-A/sVEGFR, регулирующей стабильность и контроль роста сосудов, указывает и динамика содержания антиангиогенного sVEGFR2: в подкожных лимфоузлах отмечено его снижение, тогда как повышение показателя в паховых лимфоузлах и легких не компенсировало высокие уровни VEGF-A. Полученные исследователями результаты согласуются с данными других авторов. Так, экспериментальные исследования показали, что экспрессия VEGF-A в клеточных линиях, полученных из метастатических меланом, выше, чем в линиях из первичных опухолей [22]. Установлено, что метастазирование в сигнальные и отдаленные лимфатические узлы может быть обусловлено действием VEGF-A через активацию пролиферации VEGFR2-положительных клеток в лимфатических сосудах [23]. Было показано, что у больных меланомой с метастазами в сигнальных лимфатических узлах уровень VEGF-A в плазме крови статистически значимо выше, чем у пациентов с отрицательным статусом лимфатических узлов [24]. В работе [25] продемонстрировано, что клеточные линии меланомы, полученные из первичных опухолей или метастазов в лимфатических узлах, имели более высокий уровень мРНК sVEGFR1 по сравнению с меланоцитами или клеточными линиями, полученными из кожных метастазов. По мнению авторов, изменение экспрессии sVEGFR1 может выступать в качестве механизма, регулирующего пространственную локализацию метастазов [25].

В данном исследовании было установлено, что экспериментальное воздействие новым веществом и блокатором EGFR гефитинибом ингибировало метастазирование в легкие мышей с меланомой B16/F10. При этом применение и гефитиниба, и 6EPSVan-Na, способствовало существенному снижению содержания VEGF-A в легких: ниже величин в группах отрицательного контроля и интактной, а концентрации sVEGFR1 в этой ткани оказались на уровне значений, характерных для интактных животных. Кроме того, после использования 6EPSVan-Na наблюдалась нормализация содержания sVEGFR2 в легких мышей.

Применение 6EPSVan-Na, в отличие от гефитиниба, приводило к статистически значимому по сравнению с отрицательным контролем снижению частоты метастазирования

меланомы в подмышечные лимфоузлы мышей и уменьшению частоты синхронного поражения лимфоузлов обеих анатомических зон. Следует отметить, что и динамика исследованных показателей в лимфоузлах разных анатомических зон отличалась у подопытных животных, получавших вещество 6EPSVan-Na или gefitinib. После их применения в паховых лимфоузлах мышей зафиксированы однонаправленные изменения уровня sVEGFR1 и разнонаправленные – в содержании VEGF-A и sVEGFR2. Оба препарата вызывали существенное снижение концентрации sVEGFR1 в этих органах. При этом введение gefitiniba приводило к почти двухкратному нарастанию в паховых лимфоузлах уровня VEGF-A, а содержание sVEGFR2 не претерпевало существенных изменений. Напротив, после использования 6EPSVan-Na отмечено накопление sVEGFR2 при сохранном содержании VEGF-A на уровне значений отрицательного контроля. В подмышечных лимфоузлах мышей после воздействия gefitinibом происходила модуляция уровня растворимых рецепторов – уменьшение содержания sVEGFR1 и повышение sVEGFR2 до значений нормы, тогда как применение 6EPSVan-Na способствовало выраженному, более чем в два раза, снижению содержания VEGF-A относительно отрицательного контроля.

В ряде экспериментальных работ зарубежных авторов было показано, что ингибирование VEGF-A играет важную роль в ограничении метастазирования меланомы. Так установлено, что лигустразин подавлял VEGF-A индуцированное метастазирование клеток меланомы B16/F10 в легкие [26]. Ингибитор VEGF-A VIAN-c4551 блокировал индуцированную клетками меланомы вазопроницаемость легких, экстравазацию клеток меланомы B16/F10 и рост метастазов [11]. М. С. Hsieh и соавт. [27] показали, что подавление экспрессии VEGF-A конъюгатом DC-81-индола останавливает миграцию опухолевых клеток, препятствуя метастазированию. Также известно, что gefitinib подавляет пролиферацию и инвазию клеток меланомы через сигнальный путь VEGF/AKT [28].

Полученные результаты показали, что после введения gefitiniba в лимфоузлах в ответ на снижение содержания проангиогенного sVEGFR1 происходило либо компенсаторное нарастание уровня VEGF-A, либо его стабилизация. В то же время соединение 6EPSVan-Na вызывало снижение ключевого фактора неоангиогенеза VEGF-A и в легких, и в подмышечных лимфоузлах самок мышей с меланомой B16/F10, что можно расценить как более выраженное антиангиогенное влияние, препятствующее развитию метастазов в этих органах.

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о способности нового соединения 6EPSVan-Na и ингибитора EGFR gefitiniba подавлять метастазирование меланомы B16/F10. Применение 6EPSVan-Na, аналогично gefitinibu, блокировало формирование макromетастазов в легких. Кроме того, введение 6EPSVan-Na приводило к

снижению частоты метастатического поражения подмышечных лимфоузлов и синхронного поражения подмышечных и паховых лимфоузлов. Подобное влияние раннего экспериментального воздействия 6EPSVan-Na может быть связано с более сбалансированной модуляцией факторов ангиогенеза в органах метастазирования подопытных мышей, что проявлялось в первую очередь снижением содержания VEGF-A в легких и подмышечных лимфоузлах. Результаты настоящего пилотного исследования, несмотря на имеющиеся ограничения – доклиническая модель, малая численность экспериментальных групп, свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения противоопухолевых и антиметастатических эффектов вещества 6EPSVan-Na и их механизмов.

Список литературы

1. D'Aguzzo S., Mallone F., Marengo M., Del Bufalo D., Moramarco A. Hypoxia-dependent drivers of melanoma progression // J. Exp. Clin. Cancer Res. 2021. Vol. 40 (1). P. 159. DOI: 10.1186/s13046-021-01926-6.
2. Serrati S., Raho L., De Giosa G., Porcelli L., Di Fonte R., Fasano R., Lacal P. M., Graziani G., Iacobazzi R. M., Azzariti A. Unraveling vascular mechanisms in melanoma: roles of angiogenesis and vasculogenic mimicry in tumor progression and therapeutic resistance // Cancer Biol Med. 2025. Vol. 22 (11). P. 1327–1352. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2025.0048.
3. Malekan M., Haass N. K., Rokni G. R., Gholizadeh N., Ebrahimzadeh M. A., Kazeminejad A. VEGF/VEGFR axis and its signaling in melanoma: Current knowledge toward therapeutic targeting agents and future perspectives // Life Sci. 2024. Vol. 345. P. 122563. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.122563.
4. Vanni I., Tanda E. T., Dalmasso B., Pastorino L., Andreotti V., Bruno W., Boutros A., Spagnolo F., Ghiorzo P. Non-BRAF Mutant Melanoma: Molecular Features and Therapeutical Implications // Front Mol Biosci. 2020. Vol. 7. P. 172. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00172.
5. Kato H. Drug Therapy for Melanoma: Current Updates and Future Prospects // Cancers (Basel). 2026. Vol. 18 (3). P. 382. DOI: 10.3390/cancers18030382.
6. Sabbah M., Najem A., Krayem M., Awada A., Journe F., Ghanem G. E. RTK Inhibitors in Melanoma: From Bench to Bedside. Cancers (Basel). 2021. Vol. 13 (7). P. 1685. DOI: 10.3390/cancers13071685.
7. Pastwińska J., Karaś K., Karwaciak I., Ratajewski M. Targeting EGFR in melanoma - The sea of possibilities to overcome drug resistance // Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2022. Vol. 1877 (4). P. 188754. DOI: 10.1016/j.bbcan.2022.188754.

8. Lei X., Zhang Y., Mao L., Jiang P., Huang Y., Gu J., Tai N. Prognostic value of receptor tyrosine kinases in malignant melanoma patients: A systematic review and meta-analysis of immunohistochemistry // *Front Oncol.* 2022. Vol. 12. P. 819051. DOI: 10.3389/fonc.2022.819051.
9. Simiczyjew A., Pietraszek-Gremplewicz K., Dratkiewicz E., Podgórska M., Matkowski R., Ziętek M., Nowak D. Combination of Selected MET and EGFR Inhibitors Decreases Melanoma Cells' Invasive Abilities // *Front Pharmacol.* 2019. Vol. 10. P. 1116. DOI: 10.3389/fphar.2019.01116.
10. Кит О. И., Кодониди И. П., Франциянц Е. М., Каплиева И. В., Глушко А. А., Трепитаки Л. К. и др. Противоопухолевое действие нового ингибитора рецептора эпидермального фактора роста человека // *Исследования и практика в медицине.* 2024. Т. 11 (3). С. 54–64. DOI: 10.17709/2410-1893-2024-11-3-4.
11. Perez A. L., Zamora M., Bahena M., Aramburo-Williams R., Adan-Castro E., Granados-Carrasco D., Bertsch T., Triebel J., Martinez de la Escalera G., Robles J. P., Clapp C. The antiangiogenic peptide VIAN-c4551 inhibits lung melanoma metastasis in mice by reducing pulmonary vascular permeability // *PLoS One.* 2025. Vol. 20 (5). P. e0316983. DOI: 10.1371/journal.pone.0316983.
12. Giacobbe A., Abate-Shen C. Modeling metastasis in mice: a closer look // *Trends Cancer.* 2021. Vol. 7 (10). P. 916–929. DOI: 10.1016/j.trecan.2021.06.010.
13. Sun S., Zhang J., Wang N., Kong X., Fu F., Wang H., et al. Design and Discovery of Quinazoline- and Thiourea-Containing Sorafenib Analogs as EGFR and VEGFR-2 Dual TK Inhibitors // *Molecules.* 2018. Vol. 23 (1). P. 24. DOI: 10.3390/molecules23010024.
14. Pienta K. J., Goodin P. L., Amend S. R. Defeating lethal cancer: Interrupting the ecologic and evolutionary basis of death from malignancy // *CA Cancer J. Clin.* 2025. Vol. 75 (3). P. 183–202. DOI: 10.3322/caac.70000.
15. Peinado H., Zhang H., Matei I. R., Costa-Silva B., Hoshino A., Rodrigues G., Psaila B., Kaplan R. N., Bromberg J. F., Kang Y., Bissell M. J., Cox T. R., Giaccia A. J., Erler J. T., Hiratsuka S., Ghajar C. M., Lyden D. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases // *Nat Rev Cancer.* 2017. Vol. 17 (5). P. 302–317. DOI: 10.1038/nrc.2017.6.
16. Tomita T., Kato M., Hiratsuka S. Regulation of vascular permeability in cancer metastasis // *Cancer Sci.* 2021. Vol. 112 (8). P. 2966–2974. DOI: 10.1111/cas.14942.
17. Altorki N. K., Markowitz G. J., Gao D., Port J. L., Saxena A., Stiles B., McGraw T., Mittal V. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis // *Nat. Rev. Cancer.* 2019. Vol. 19 (1). P. 9–31. DOI: 10.1038/s41568-018-0081-9.
18. Yang Y., Cao Y. The impact of VEGF on cancer metastasis and systemic disease // *Seminars in Cancer Biology.* 2022. Vol. 86 (3). P. 251–261. DOI: 10.1016/j.semcancer.2022.03.011.

19. Colotti G., Failla C. M., Lacal P. M., Ungarelli M., Ruffini F., Di Micco P., et al. Neuropilin-1 is required for endothelial cell adhesion to soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 // *FEBS J.* 2022. Vol. 289 (1). P. 183–198. DOI: 10.1111/febs.16119.
20. Lee C., Kim M. J., Kumar A., Lee H. W., Yang Y., Kim Y. Vascular endothelial growth factor signaling in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic perspectives // *Signal Transduct Target Ther.* 2025. Vol. 10 (1). P. 170. DOI: 10.1038/s41392-025-02249-0.
21. Atzori M. G., Ceci C., Ruffini F., Scimeca M., Cicconi R., Mattei M., et al. The Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR-1) D16F7 Monoclonal Antibody Inhibits Melanoma Adhesion to Soluble VEGFR-1 and Tissue Invasion in Response to Placenta Growth Factor // *Cancers (Basel).* 2022. Vol. 14 (22). P. 5578. DOI: 10.3390/cancers14225578.
22. Ceci C., Atzori M. G., Lacal P. M., Graziani G. Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21 (4). P. 1388. DOI: 10.3390/ijms21041388.
23. Hirakawa S., Kodama S., Kunstfeld R., Kajiya K., Brown L. F., Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis // *J. Exp. Med.* 2005. Vol. 201 (7). P. 1089–1099. DOI: 10.1084/jem.20041896.
24. Treskova I., Topolcan O., Windrichova J., Simanek V., Slouka D., Treska V., Kucera R. OPG, OPN, EGF and VEGF Levels at Individual Breslow Score Stages in Malignant Melanoma // *Anticancer Res.* 2018. Vol. 38 (8). P. 4907–4911. DOI: 10.21873/anticancer.12806.
25. Ruffini F., Failla C. M., Orecchia A., Bani M. R., Dorio A. S., Fortes C., et al. Expression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in cutaneous melanoma: role in tumour progression // *Br. J. Dermatol.* 2011. Vol. 164 (5). P. 1061–1070. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2010.10200.x.
26. Chen L., Lu Y., Wu J. M., Xu B., Zhang L. J., Gao M., Zheng S. Z., Wang A. Y., Zhang C. B., Zhang W. W., Lei N. Ligustrazine inhibits B16F10 melanoma metastasis and suppresses angiogenesis induced by Vascular Endothelial Growth Factor // *Biochemical and biophysical research communications.* 2009. Vol. 386 (2). P. 374–379 DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.06.042.
27. Hsieh M. C., Hu W. P., Yu H. S., Wu W. C., Chang L. S., Kao Y. H., Wang J. J. A DC -81 - indole conjugate agent suppresses melanoma A375 cell migration partially via interrupting VEGF production and stromal cell - derived factor -1 α -mediated signaling // *Toxicology and applied pharmacology.* 2011. Vol. 255 (2). P. 150–159 DOI: 10.1016/j.taap.2011.06.008.
28. Wan X., Zhu Y., Zhang L., Hou W. Gefitinib inhibits malignant melanoma cells through the VEGF/AKT signaling pathway // *Mol. Med. Rep.* 2018. Vol. 17 (5). P. 7351–7355. DOI: 10.3892/mmr.2018.8728.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Финансирование: Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

Financing: The research was performed without external funding.