

УДК 615.277.3:615.015.11

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2024-9-3-74-85>

# ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ И МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ С ПРЕДПОЛАГАЕМОМ ПРОТИВО-ОПУХОЛЕВЫМ ДЕЙСТВИЕМ В ХОДЕ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ. ОТ ТЕОРИИ К РЕАЛЬНОЙ ПРАКТИКЕ

ДОДОХОВА М.А.<sup>1\*</sup>, АКИМЕНКО М.А.<sup>1</sup>, ВОРОНОВА О.В.<sup>2</sup>, АЛХУСЕЙН-КУЛЯГИНОВА М.С.<sup>1</sup>, КОРНИЕНКО Н.А.<sup>1</sup>, ГУЛЯН М.В.<sup>1</sup>, ГЮЛЬМАМЕДОВ Д.Н.<sup>1</sup>, АЛАШЕВА М.-М. Х.<sup>1</sup>, КАЗИМАГОМЕДОВА Э.Ш.<sup>1</sup>, ШПАКОВСКИЙ Д.Б.<sup>3</sup>, МИЛАЕВА Е.Р.<sup>3</sup>, КОТИЕВА И.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Россия

<sup>2</sup> ГБУ Ростовской области «Патолого-анатомическое бюро», г. Ростов-на-Дону, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», г. Москва, Россия

## Резюме

**Цель.** Выявить наиболее целесообразные для углубленного изучения патогенетические механизмы реализации противоопухолевого и антиметастатического действия тестируемых гибридных оловоорганических соединений с помощью иммуногистохимического метода.

**Материалы и методы.** В качестве тестируемого соединения было исследована субстанция бис(3,5-ди-трет-бутил-4- гидроксифенилтиолат) диметилолова (лабораторный шифр Ме-3), относящаяся к классу гибридных оловоорганических соединений. Экспериментальная часть выполнена на 30 мышах линии C57Bl/6 (самки) с использованием универсальной модели перевиваемых опухолей со спонтанным метастазированием – меланомы B16. Через 48 часов после перевивки опухолевых клеток мышам-самкам линии C57Bl/6 Ме-3 вводили внутривенно 1 раз в сутки в течение 10 дней в суммарной дозе (СД) 375 мг/кг. Для морфологического анализа был использован первичный опухолевый узел меланомы B16, подготовка тканей была проведена по стандартной схеме. Иммунофенотипирова-

ние образцов ткани меланомы B16 мышей, полученных в эксперименте, проводили с использованием первичных антител: Polyclonal Antibody to Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFβ1) (Elabscience, dilution of 1:100), Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) (Elabscience, dilution of 1:200), Polyclonal Antibody to Bcl2 Associated X Protein (Bcl2) (Elabscience, dilution of 1:100), Polyclonal Antibody to Cluster Of Differentiation 34 (CD34) Elabscience, dilution of 1:200).

**Результаты.** В нашем исследовании под действием гибридного оловоорганического соединения (Ме-3) в опухолевой ткани активность иммуногистохимической реакции с антителами к TGF-β1 и Bcl-2 снижалась, модификация процесса образования патологических новых кровеносных сосудов и сосудоподобных структур из опухолевых клеток отмечалась только в метронульном режиме введения Ме-3 (десятикратно, в низкой дозировке).

**Заключение.** По результатам поискового иммуногистохимического исследования ткани меланомы B16 мышей при введении гибридных оловоорганических соединений наиболее

## Для цитирования:

Додохова М. А., Акименко М. А., Воронова О. В., Алхусейн-Кулягинова М. С., Корниенко Н. А., Гулян М. В., Гюльмамедов Д. Н., Алашева М.-М. Х., Казимагомедова Э. Ш., Шпаковский Д. Б., Милаева Е. Р., Котиева И. М. Возможности иммуногистохимических методов для оценки токсичности и механизма действия соединений с предполагаемым противоопухолевым действием в ходе доклинического исследования. От теории к реальной практике. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2024;9(3): 74-85. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2024-9-3-74-85>

## \*Корреспонденцию адресовать:

Додохова Маргарита Авдеевна, 344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., д. 29, E-mail: [dodokhova@mail.ru](mailto:dodokhova@mail.ru)

© Додохова М. А. и др.

целесообразными для углубленного изучения были выбраны два патогенетических механизма реализации противоопухолевого и антиметастатического действия тестируемых соединений: апоптотический и антинеоангиогенетический. Для наиболее эффективного доклинического отбора новых перспективных соединений с предполагаемым противоопухолевым действием необходимо расширять границы применения специфических морфологических методов, в том числе и иммуногистохимических.

**Ключевые слова:** доклинические исследования, противоопухолевые лекарственные средства, иммуногистохимия, морфологический метод, гибридные оловоорганические соединения.

#### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

#### Источник финансирования

Грант РФФ 22-63-00016.

## ORIGINAL RESEARCH

# IMMUNOHISTOCHEMISTRY FOR ASSESSING TOXICITY AND MECHANISM OF ACTION OF ANTICANCER DRUGS DURING PRECLINICAL TRIALS. FROM THEORY TO PRACTICE

MARGARITA A. DODOKHOVA<sup>1\*</sup>, MARINA A. AKIMENKO<sup>1</sup>, OLGA V. VORONOVA<sup>2</sup>,  
MARGARITA S. ALKHUSEIN-KULYAGINOVA<sup>1</sup>, NATALIA A. KORNIENKO<sup>1</sup>, MARINA V. GULYAN<sup>1</sup>,  
DAVID N. GYULMAMEDOV<sup>1</sup>, MILANA-MARIAT KH. ALASHEVA<sup>1</sup>, ESMIRA SH. KAZIMAGOMEDOVA<sup>1</sup>,  
DMITRY B. SHPAKOVSKY<sup>3</sup>, ELENA R. MILAEVA<sup>3</sup>, INGA M. KOTIEVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>2</sup>Regional Department of Pathology, Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

## Abstract

**Aim.** To identify the most suitable pathogenetic mechanisms for in-depth study of the antitumor and antimetastatic effects of tested hybrid organotin compounds using the immunohistochemical approach.

**Materials and Methods.** Here, we tested bis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenylthiolate) dimethyltin (laboratory code Me-3), belonging to the class of hybrid organotin compounds, on 30 female C57Bl/6 mice using a universal model of transplantable tumors with spontaneous metastasis (B16 melanoma). 48 hours after tumor cell transplantation, we intraperitoneally administered Me-3 once daily to female C57Bl/6 mice for 10 days at a total dose (TD) of 375 mg/kg. For histological analysis, we used the primary tumor node of B16 melanoma. Immunophenotyping of B16 melanoma tissue samples was carried

out using the polyclonal antibodies to transforming growth factor beta 1 (TGFβ-1), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), Bcl2-associated X Protein (Bcl-2), cluster of differentiation 34 (CD34).

**Results.** After the exposure to Me-3, we found a reduced immunohistochemical signal to TGFβ-1 and Bcl-2 in the tumor tissue. Low doses of Me-3 have also impacted angiogenesis.

**Conclusion.** Me-3 has a pro-apoptotic and anti-angiogenic effects on B16 melanoma cells in C57Bl/6 mice.

**Keywords:** preclinical studies, antitumor drugs, immunohistochemistry, angiogenesis, hybrid organotin compounds.

**Conflict of Interest.** None declared.

**Funding.** Russian Science Foundation grant #22-63-00016.

◀ English

#### For citation:

Margarita A. Dodokhova, Marina A. Akimenko, Olga V. Voronova, Margarita S. Alkhusein-Kulyaginova, Natalia A. Kornienko, Marina V. Gulyan, David N. Gyulmamedov, Milana-Mariat Kh. Alasheva, Esmira Sh. Kazimagomedova, Dmitry B. Shpakovsky, Elena R. Milaeva, Inga M. Kotieva. Immunohistochemistry for assessing toxicity and mechanism of action of anticancer drugs during preclinical trials. From theory to practice. *Fundamental and Clinical Medicine*. (In Russ.). 2024;9(3): 74-85. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2024-9-3-74-85>

#### \*Corresponding author:

Dr. Margarita A. Dodokhova, 29, Nakhichevansky Lane, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation, E-mail: [dodokhova@mail.ru](mailto:dodokhova@mail.ru)  
© Margarita A. Dodokhova, et al.

## Введение

Разработка новых отечественных противоопухолевых лекарственных средств является приоритетной задачей в области доклинических исследований для междисциплинарных научных коллективов. В настоящее время активно ведется изучение лекарственных субстанций с противоопухолевым действием на основе органических производных металлов [1]. Многочисленные переменные, доступные для модификации (металл, лиганд и взаимодействие металл-лиганд), открывают уникальные возможности для разработки лекарств и привели к созданию обширного портфеля металлопрепаратов, которые могут демонстрировать большее разнообразие функций и механизмов действия, по сравнению с чистыми органическими веществами структуры [2]. Металлоорганические соединения на основе олова являются перспективными кандидатами и широко изучаются в России и за рубежом [3,4]. Многочисленные исследования оловоорганических соединений на моделях опухолевых клеточных линий *in vitro* убедительно доказывают реализацию антипролиферативного действия через многофакторный механизм [5]. Доклинические исследования *in vivo* ограничены высокой системной токсичностью и не отличаются комплексным характером [6].

Тестируемые нами оловоорганические соединения являются гибридными, то есть содержат протекторный фенольный фрагмент. Путем введения в молекулу защитной антиоксидантной фенольной группы при направленном синтезе успешно решена проблема избыточной системной токсичности [7, 8].

При проведении скринингового доклинического исследования линейки аналоговых гибридных оловоорганических соединений по результатам изучения противоопухолевой и антиметастатической фармакологической активности на двух экспериментальных моделях солидных опухолей мышей были выбраны соединения-лидеры [9, 10].

Выявление предполагаемого механизма действия для выбранных соединений носило поисковый характер и включало различные методики обнаружения, в том числе и расширенное морфологическое исследование.

На протяжении долгого времени традиционная визуализация тканей с использованием окрашивания гематоксилином и эозином была ключом к диагностике злокачественных новообразований, а также основной рабочей плат-

формой, используемой для выяснения биологии опухоли [11, 12].

Иммуногистохимический анализ на современном этапе развития медицины является неотъемлемым методом тканевой диагностики и обнаружения биомаркеров, получившим широкое распространение во всем мире. Иммуногистохимическая визуализация в клинической практике играет важную роль в характеристике ткани опухоли и ее микроокружения, включая сосудистую архитектуру и гипоксию, клеточную пролиферацию, гибель клеток [13, 14], а также для подтверждения типа опухолевых клеток и возможного происхождения метастатического очага неизвестной первичной локализации [15]. Именно правильно подобранные прогностические биомаркеры играют важную роль при диагностической иммуногистохимии опухолей [16].

В данной работе нами описывается использование иммуногистохимических маркеров в доклиническом изучении соединений с предполагаемым противоопухолевым действием (лабораторный шифр Ме-3, бис(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)тиолат диметилолова) для поисковых исследований возможных патогенетических механизмов реализации противоопухолевой и антиметастатической фармакологической активности.

В качестве молекулярно-биологического маркера для оценки активности злокачественного процесса в эксперименте определена экспрессия трансформирующего фактора роста бета 1 (Transforming Growth Factor beta 1, TGF- $\beta$ 1); для исследования процесса образования патологических новых кровеносных сосудов, играющих важную роль в молекулярном патогенезе опухолевого роста, – экспрессия фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF-A); для оценки образования сосудоподобных структур при васкулогенной мимикрии использовался эндотелиальный белок CD34; для изменения апоптотических процессов в клетке опухоли была изучена экспрессия регулятора апоптоза (Apoptosis regulator Bcl-2).

## Цель исследования

Выявить наиболее целесообразные для углубленного изучения патогенетические механизмы реализации противоопухолевого и антиметастатического действия тестируемых гибридных оловоорганических соединений с помощью иммуногистохимического метода.

## Материалы и методы

В качестве тестируемого соединения была исследована субстанция бис(3,5-ди-*трет*-бутил-4- гидроксифенилтиолат) диметиллова (лабораторный шифр Ме-3), относящаяся к классу гибридных оловоорганических соединений. Экспериментальная часть выполнена на 30 мышах линии C57Bl/6 (самки) с использованием универсальной модели перевиваемых опухолей со спонтанным метастазированием – меланомы B16. Через 48 часов после перевивки опухолевых клеток мышам-самкам линии C57Bl/6 Ме-3 вводили внутривентриально 1 раз в сутки в течение 10 дней в суммарной дозе (СД) 375 мг/кг (моделирование метронического режима химиотерапии). Морфологическое исследование выполнено на базе клинической больницы «Клиническая больница «РЖД-Медицина»». Образцы опухолевой ткани меланомы B16 мышей для световой микроскопии и иммуногистохимического исследования фиксировали 10% забуференным нейтральным формалином. Гистологическая проводка образцов ткани осуществлялась в автоматическом вакуумном гистологическом процессоре ASP6025 (Leica, Germany). После проводки образцы ткани заливались в парафин с использованием модульной заливочной станции EG1150H (Leica, Germany). На ротационном микротоме RM2245 (Leica, Germany) из парафиновых блоков с образцами ткани изготавливали серийные срезы. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином по классическому протоколу. Иммунофенотипирование образцов опухолевой ткани проводили с использованием автоматической платформы для проведения IHC и ISH исследований BOND-MAX (Leica, Germany).

Из парафиновых блоков с образцами ткани изготавливали срезы толщиной 2–3 мкм и наносили на предметные стекла с поли-L-лизинным покрытием. Предподготовка стекол для иммуногистохимического окрашивания включает в себя депарафинизацию и демаскировку антигенов. Буфер для температурной демаскировки брался с pH 6,0 или pH 9,0 в соответствии с аннотацией к первичным антителам. Микроскопическое исследование и фотофиксацию полученных иммуногистохимических препаратов осуществляли с помощью светового микроскопа «Leica DM4000B». Уровень экспрессии иммуногистохимических маркеров оценивался полуколичественным способом в

баллах: 0 – отсутствие реакции, 1 – слабая реакция, 2 – умеренная реакция, 3 – выраженная реакция маркер-позитивных элементов.

Иммунофенотипирование образцов ткани меланомы B16 мышей, полученных в эксперименте, проводили с использованием первичных антител: Polyclonal Antibody to Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFb1) (Elabscience, dilution of 1:100), Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) (Elabscience, dilution of 1:200), Polyclonal Antibody to Bcl2 Associated X Protein (Bcl2) (Elabscience, dilution of 1:100), Polyclonal Antibody to Cluster Of Differentiation 34 (CD34) (Elabscience, dilution of 1:200).

## Результаты

При поисковом иммуногистохимическом исследовании для оценки токсичности и механизма действия соединений (Ме-3) с предполагаемым противоопухолевым действием нами были выявлены следующие изменения в исследуемых образцах.

При анализе эффекта TGFb1 выявлено, что почти все клетки окружающих тканей и большинство опухолевых клеток активно экспрессируют данный фактор (**рисунок 1**). При воздействии соединения с предполагаемым противоопухолевым эффектом (Ме-3) на опухолевую ткань наблюдается слабая неравномерная экспрессия TGFb1 (**рисунок 2**).

При анализе антитела Bcl2, отвечающего за регуляцию апоптоза в организме, отмечено снижение его экспрессии при использовании соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (Ме-3) (**рисунок 3**), в сравнении с группой без применения данных соединений, где сверхэкспрессия белков Bcl2 свидетельствует об уклонении клеток от гибели и прогрессировании метастазирования опухолевого процесса (**рисунок 4**).

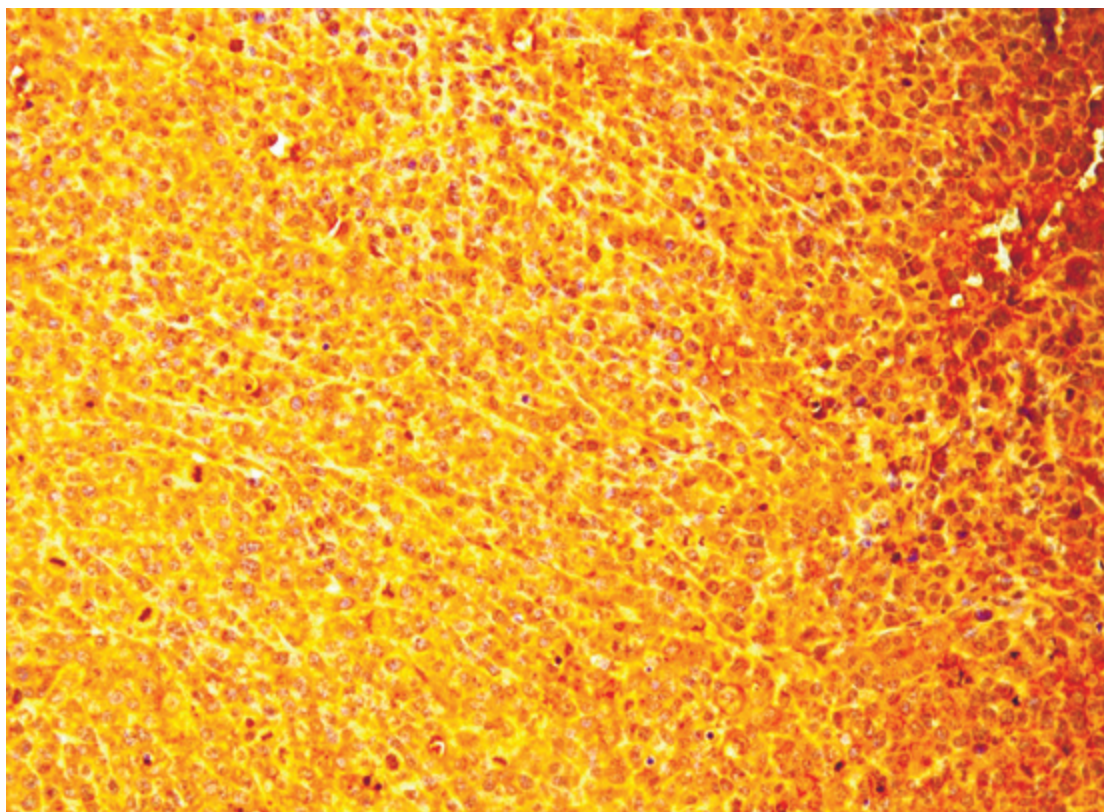
При анализе экспрессии VEGF-A, важного антитела при оценке васкуло- и ангиогенеза, регистрировалось снижение экспрессии маркера при использовании соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (Ме-3) (**рисунок 5**) относительно группы сравнения (**рисунок 6**).

При переходе от эндотелий-зависимых сосудов к имитированным сосудам мозаичные сосуды встречаются как переходный тип между эндотелий-зависимыми сосудами и каналами васкулогенной мимикрии, при этом в васкуляризации опухоли участвуют как эндотелий, так



**Рисунок 1.** Иммуновизуализация антитела TGFβ-1, выраженная экспрессия в опухолевых клетках меланомы B16 мышей без применения соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (Me-3), ×200.

**Figure 1.** Detection of anti-TGFβ-1 antibody: significant expression in melanoma B16 cells in mice which were not treated with an anti-tumor compound (Me-3), ×200 magnification.



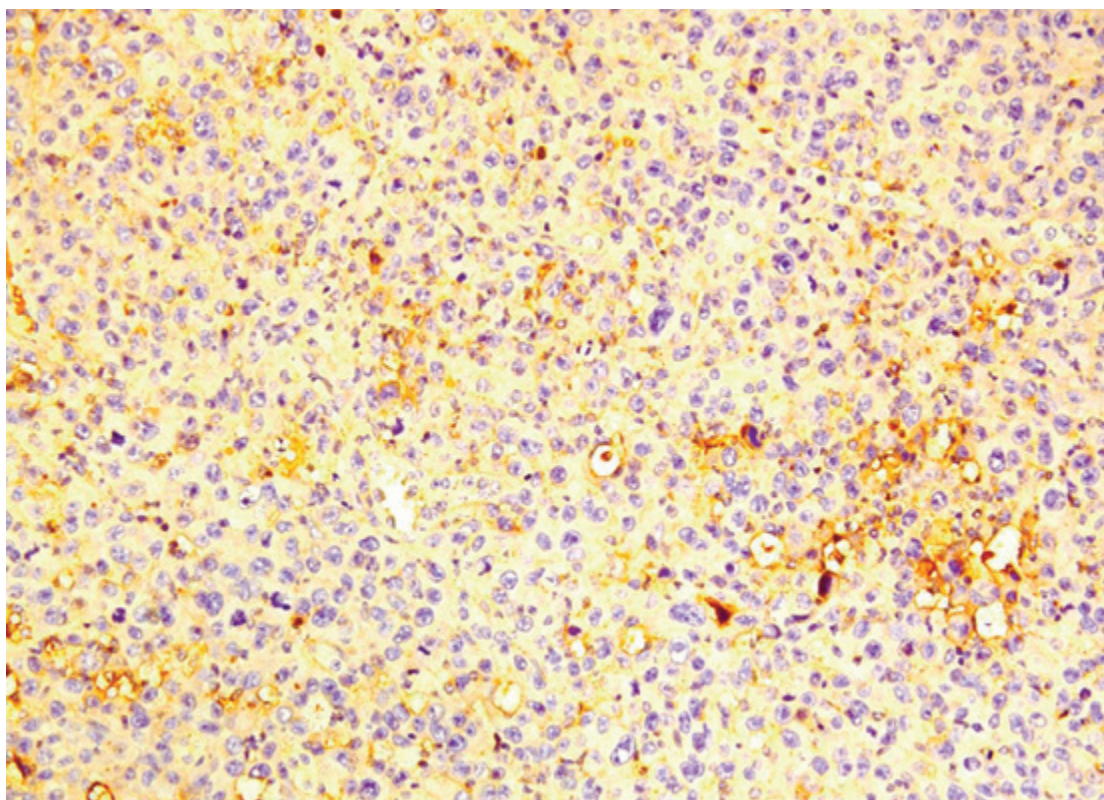
и опухолевые клетки. Именно иммуногистохимическое окрашивание с использованием CD34 является золотым стандартом диагностики васкулогенной мимикрии при злокачественных опухолях (рисунок 7, 8).

## Обсуждение

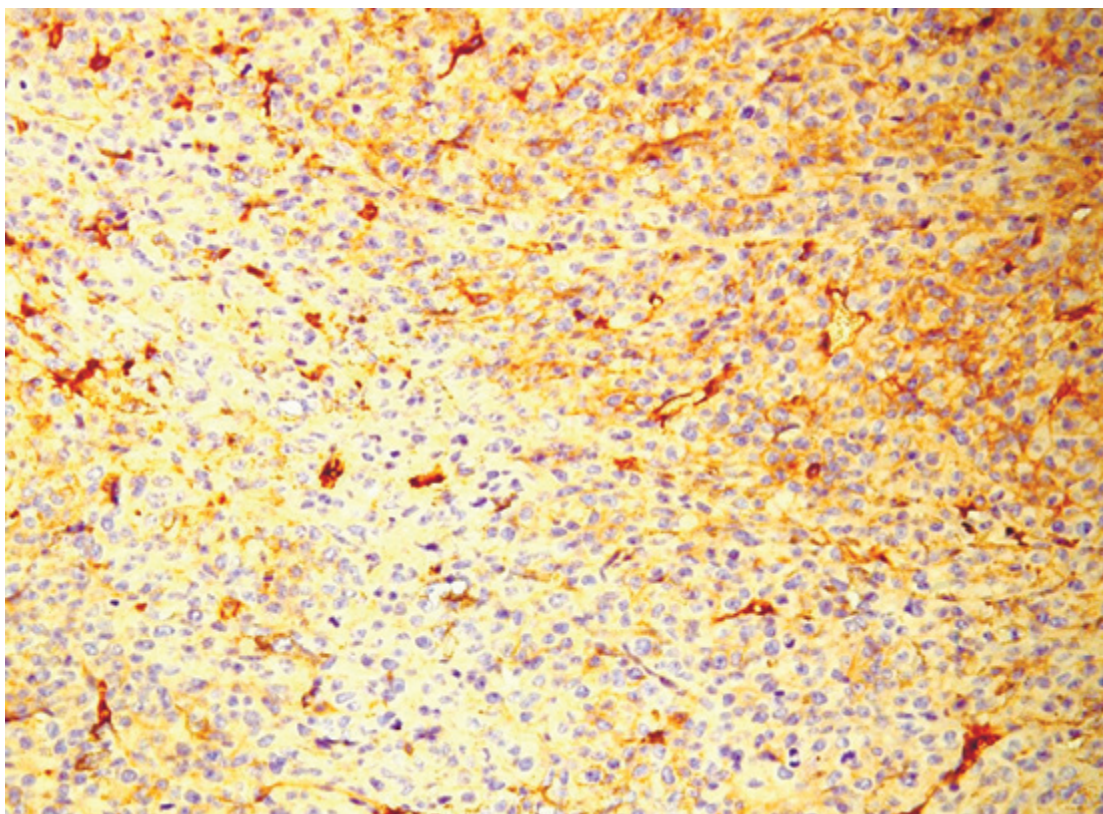
Более чем десятилетний опыт клинической практики подчеркивает быструю эволюцию тестирования биомаркеров и подтверждает терапевтическую значимость такого исследования

**Рисунок 2.** Иммуновизуализация антитела TGFβ-1, слабая неравномерная экспрессия в опухолевых клетках меланомы B16 мышей с применением соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (Me-3), ×200.

**Figure 2.** Detection of anti-TGFβ-1 antibody: weak, uneven expression in melanoma B16 cells in mice which were treated with an anti-tumor compound (Me-3), ×200 magnification.





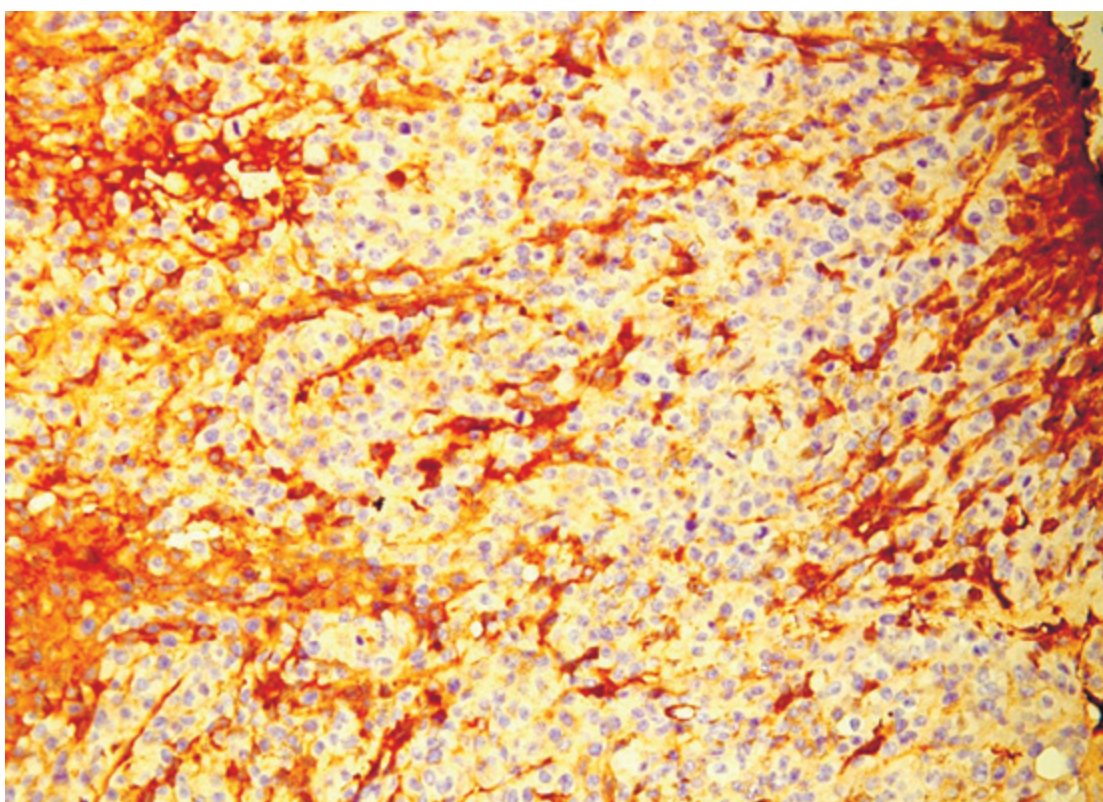


**Рисунок 3.** Иммуновизуализация антитела Bcl-2, снижение экспрессии в опухолевых клетках меланомы B16 мышей с применением соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (Me-3),  $\times 200$ .

**Figure 3.** Detection of anti-Bcl2 antibody: decreased expression in melanoma B16 cells in mice which were treated with an anti-tumor compound (Me-3),  $\times 200$  magnification.

для всех пациентов [17]. Иммуногистохимические методы обладают высокой воспроизводимостью и относительно эффективны с точки зрения затрат, что делает их ценными новыми инструментами в онкологической практике [18].

Иммуногистохимические маркеры в поисковых доклинических исследованиях соединений с предполагаемым противоопухолевым действием, на наш взгляд, используются недостаточно.



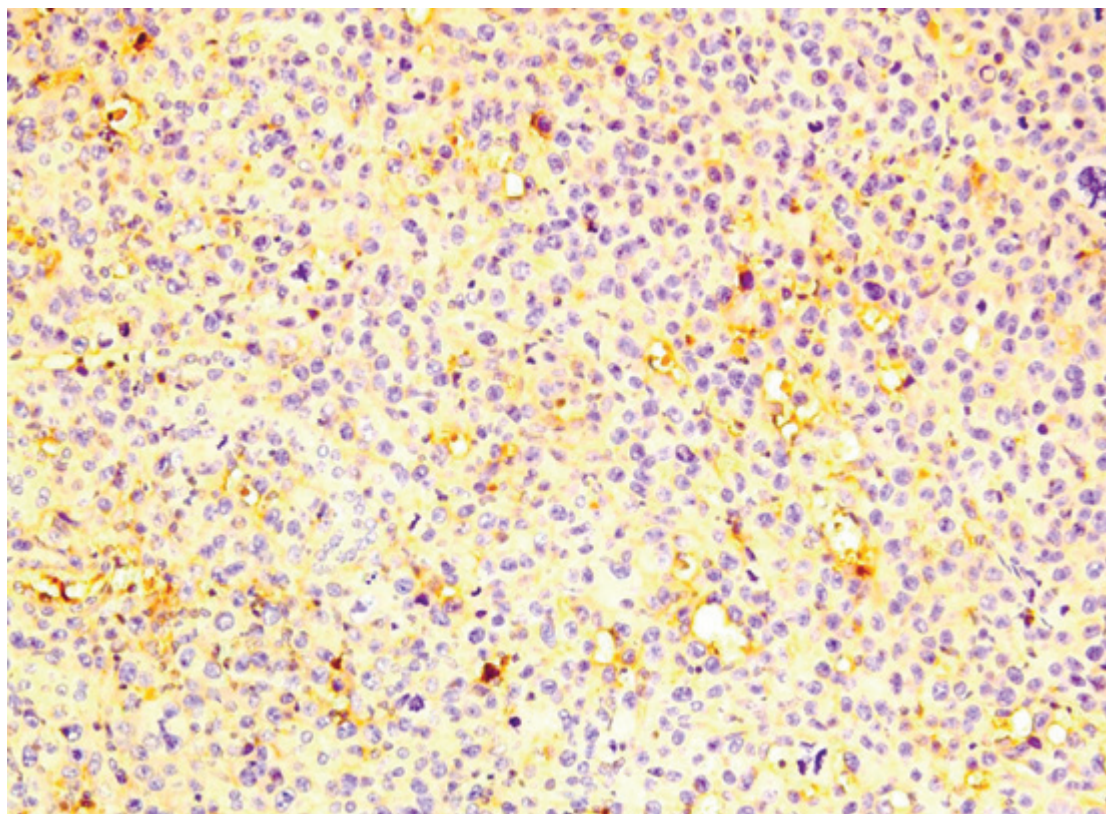
**Рисунок 4.** Иммуновизуализация антитела Bcl-2, выраженная экспрессия в опухолевых клетках меланомы B16 мышей без применения соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (Me-3),  $\times 200$ .

**Figure 4.** Detection of anti-Bcl2 antibody: significant expression in melanoma B16 cells in mice which were not treated with an anti-tumor compound (Me-3),  $\times 200$  magnification.



**Рисунок 5.** Иммуновизуализация антитела VEGFA, снижение экспрессии в опухолевых клетках меланомы B16 мышей с применением соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (Me-3),  $\times 200$ .

**Figure 5.** Detection of anti-VEGFA antibody: decreased expression in melanoma B16 cells in mice which were treated with an anti-tumor compound (Me-3),  $\times 200$  magnification.

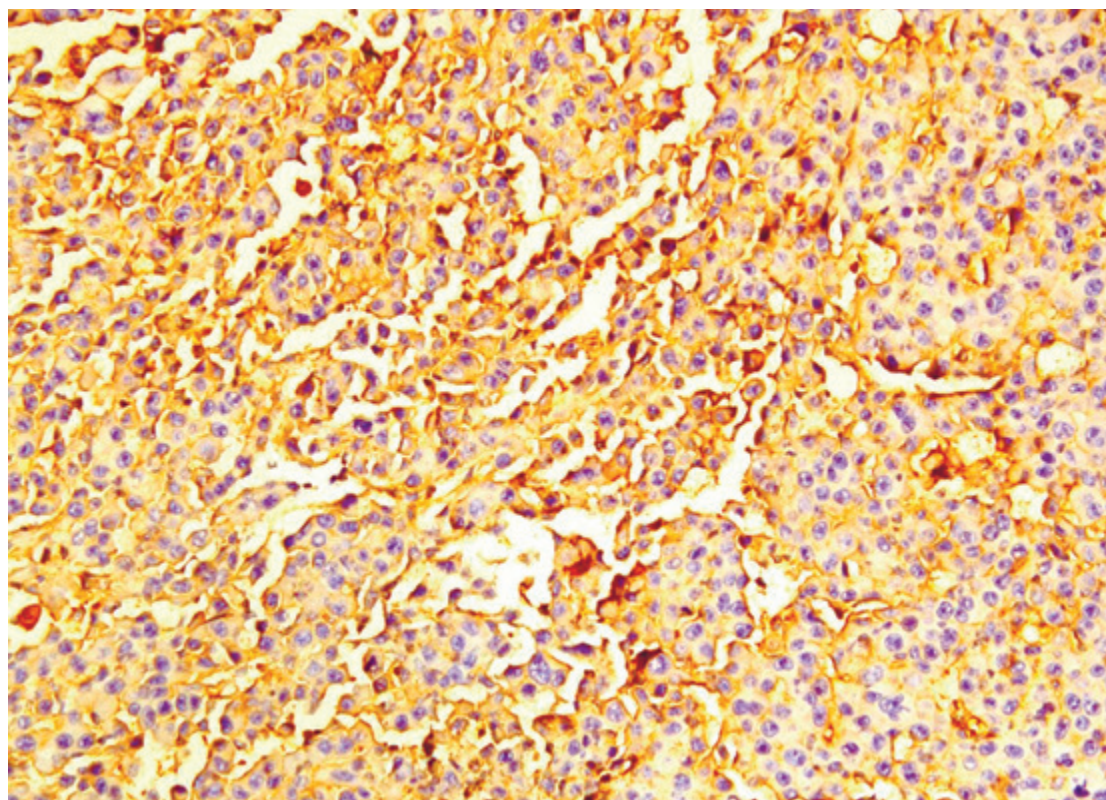


Трансформирующий фактор роста бета 1 (TGF- $\beta$ 1) регулирует множество внутренних клеточных процессов в опухолевой клетке [19, 20]. Экспрессия данного белка может быть определена в качестве молекулярно-биологи-

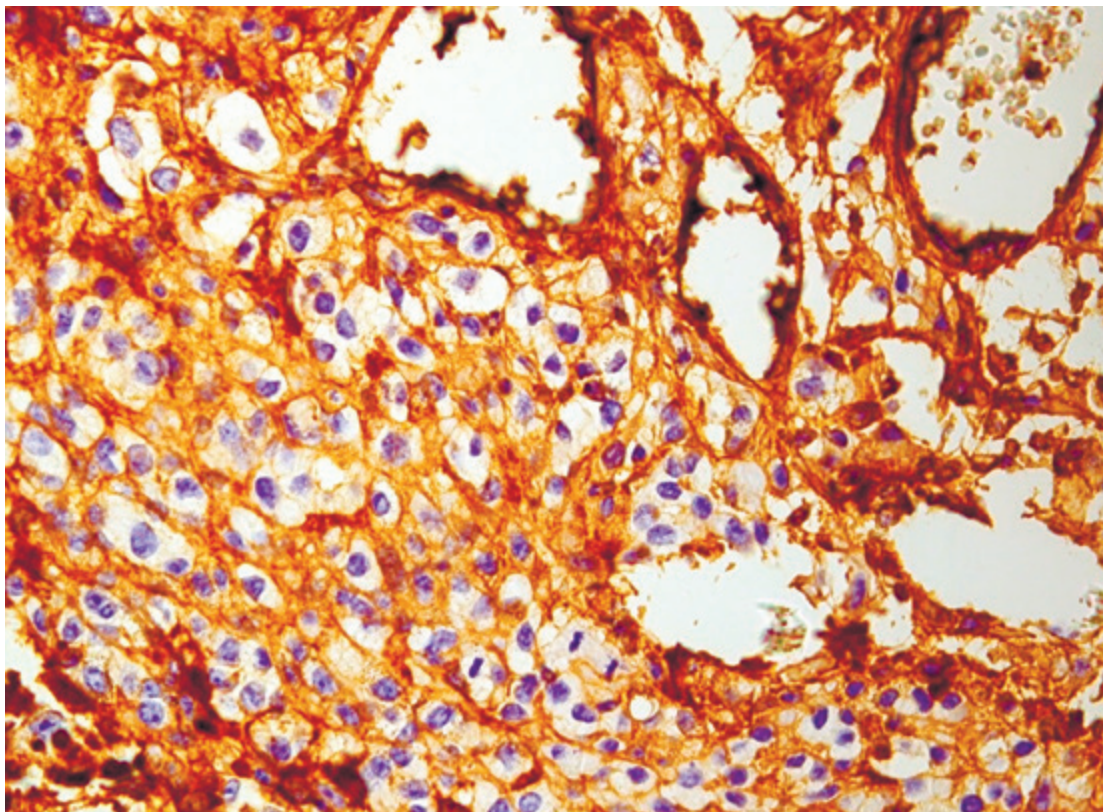
ческого маркера для оценки активности злокачественного процесса в эксперименте. В нашем исследовании при действии гибридного оловоорганического соединения Me-3 в опухолевой ткани активность иммуногистохимической ре-

**Рисунок 6.** Иммуновизуализация антитела VEGFA, выраженная экспрессия в опухолевых клетках меланомы B16 мышей без применения соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом,  $\times 200$ .

**Figure 6.** Detection of anti-VEGFA antibody: significant expression in melanoma B16 cells in mice which were not treated with an anti-tumor compound (Me-3),  $\times 200$  magnification.





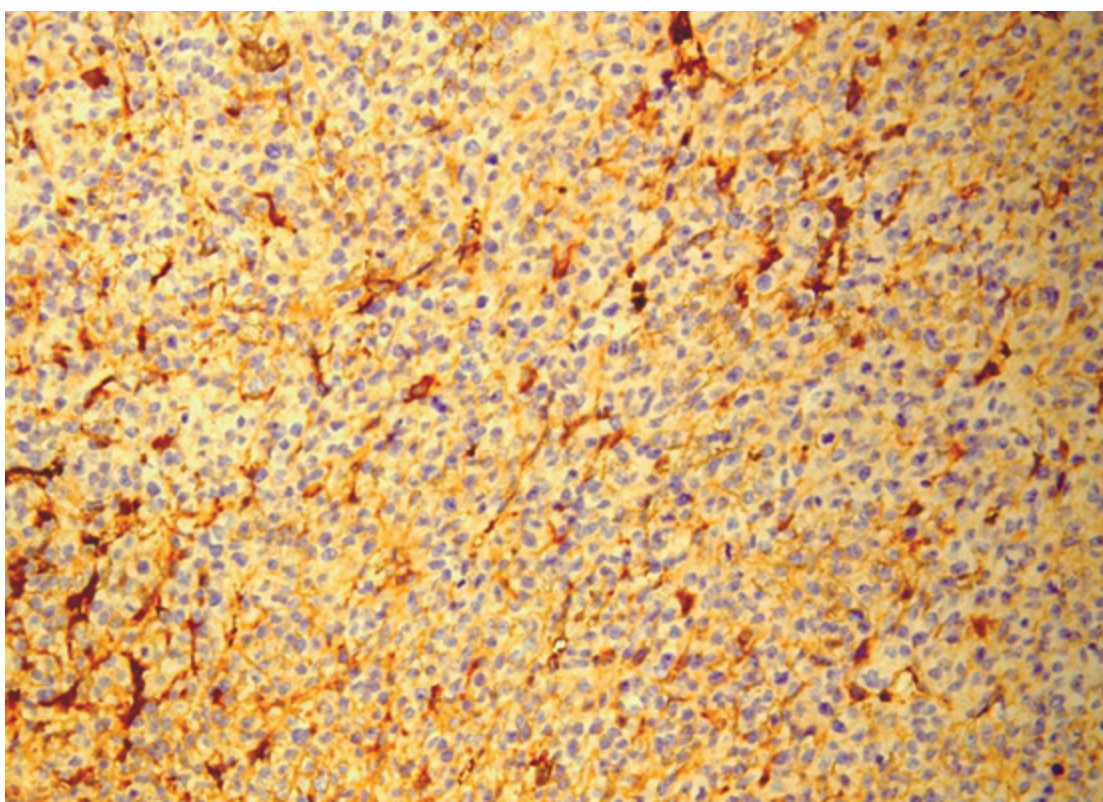


**Рисунок 7.** Иммуновизуализация антитела CD34, выраженная экспрессия в микроциркуляторном русле опухоли меланомы B16 мышей без применения соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом,  $\times 200$ .

**Figure 7.** Detection of anti-CD34 antibody: significant expression in melanoma B16 cells in mice which were not treated with an anti-tumor compound (Me-3),  $\times 200$  magnification.

акции с антителами к TGF- $\beta$ 1 снижалась, что может свидетельствовать о целесообразности дальнейшей разработки данного класса соединений в качестве перспективных кандидатов в противоопухолевые лекарственные препараты.

При введении Me-3 в опухолевой ткани произошло изменение (усиление) активности апоптотического маркера Bcl-2, который играет ключевую роль в регуляции митохондриального пути апоптоза. Избыточное воздействие



**Рисунок 8.** Иммуновизуализация антитела CD34, умеренная экспрессия в микроциркуляторном русле опухоли меланомы B16 мышей с применением соединений с предполагаемым противоопухолевым эффектом (Me-3),  $\times 200$ .

**Figure 8.** Detection of anti-CD34 antibody: moderate expression in melanoma B16 cells in mice which were treated with an anti-tumor compound (Me-3),  $\times 200$  magnification.



антиапоптотического гена Bcl-2 может ингибировать апоптоз, тогда как дополнительное воздействие проапоптотического гена Вах может обратить биологическую активность Bcl-2 и вызвать апоптоз. Изменение иммуновизуализации антитела Bcl-2 в опухолевой ткани после введения Ме-3 позволяет предположить реализацию противоопухолевого действия по пути активизации апоптоза и изменению митохондриального метаболизма, что требует углубленного исследования.

Модификация процесса образования патологических новых кровеносных сосудов и сосудоподобных структур из опухолевых клеток (феномен васкулогенной мимикрии), играющих важную роль в молекулярном патогенезе опухолевого роста, отмечалась только в метрономном режиме введения Ме-3 (десятикратно, в низкой дозировке). Метрономная химиотерапия гибридными оловоорганическими соединениями может рассматриваться как компонент паллиативной химиотерапии в эксперименте, что согласуется с литературными

данными о перекрестном взаимодействии в опухолевом микроокружении между опухолевыми клетками и эндотелиальными клетками [21].

## Заключение

По результатам поискового иммуногистохимического исследования ткани меланомы B16 мышей при введении гибридного оловоорганического соединения в метрономном режиме лечения наиболее целесообразными для углубленного изучения были выбраны два патогенетических механизма реализации противоопухолевого и антиметастатического действия тестируемых соединений: апоптотический и антинеоангиогенный.

Для наиболее эффективного доклинического отбора новых перспективных соединений с предполагаемым противоопухолевым действием необходимо расширять границы применения специфических морфологических методов, в том числе и иммуногистохимических.

## Литература:

1. González-Ballesteros M.M., Mejía C., Ruiz-Azuara L. Metallodrugs: an approach against invasion and metastasis in cancer treatment. *FEBS Open Bio*. 2022;12(5):880–899. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13381>
2. Peña Q., Wang A., Zaremba O., Shi Y., Scheeren HW., Metselaar JM., Kiessling F., Pallares RM., Wuttke S., Lammers T. Metallodrugs in cancer nanomedicine. *Chem. Soc. Rev*. 2022;51(7):2544–2582. <https://doi.org/10.1039/d1cs00468a>
3. Syed Annuar S.N., Kamaludin N.F., Awang N., Chan K.M. Cellular basis of organotin(IV) derivatives as anticancer metallodrugs: A Review. *Fron. Chem*. 2021;9:657599. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.657599>
4. Milaeva E.R., Shpakovsky D.B., Gracheva Y.A., Antonenko T.A., Ksenofontova T.D., Nikitin E.A., Berseneva D.A. Novel selective anticancer agents based on sn and au complexes. Mini-review. *Pure and Applied Chemistry*. 2020;92(8):1201–1216. <https://doi.org/10.1515/pac-2019-1209>
5. Милаева Е.Р., Додохова М.А., Шпаковский Д.Б., Антоненко Т.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Комарова Е.Ф., Ганцгорн Е.В., Алхусейн-Кулягинова М.С. Механизмы цитотоксического действия оловоорганических соединений. *Биомедицина*. 2021;17(2):88–99. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-88-99>
6. Додохова М.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Сухорукова Н.В., Ганцгорн Е.В., Алхусейн-Кулягинова М.С., Комарова Е.Ф., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р. Оценка фармакотерапевтического потенциала оловоорганических соединений in vivo. *Биофармацевтический журнал*. 2021;13(3):30–34. <https://doi.org/10.30906/2073-8099-2021-13-3-30-34>
7. Додохова М.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Комарова Е.Ф., Трепель В.Г., Алхусейн-Кулягинова М.С., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р. Исследование острой пероральной токсичности оловоорганических соединений, содержащих фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола. *Уральский медицинский журнал*. 2021;20(3):73–77. <https://doi.org/10.52420/2071-5943-2021-20-3-73-77>
8. Додохова М.А., Воронова О.В., Котиева И.М., Сафроненко А.В., Шлык С.В., Дробот Н.В., Акименко М.А., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р. Сравнительный анализ морфологических и биохимических изменений при однократном внутрижелудочном введении гибридных оловоорганических соединений. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2023;38(1):167–174. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-167-174>
9. Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R. Impact of organotin compounds on the growth of epidermoid Lewis carcinoma. *Research Results in Pharmacology*. 2021;7(4):81–88. <https://doi.org/10.3897/rpharmacology.7.71455>
10. Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Shpakovsky D.B., Milaeva E.R. Evaluation of the pharmacological activity of hybrid organotin compounds in a B16 melanoma model in the classical and metronomic administration modes. *Research Results in Pharmacology*. 2022;8(1):85–94.
11. Koh J., Kwak Y., Kim J., Kim W.H. High-Throughput Multiplex Immunohistochemical Imaging of the Tumor and Its Microenvironment. *Cancer Res. Treat*. 2020;52(1):98–108. <https://doi.org/10.4143/crt.2019.195>
12. Workman S., Jabbour S.K., Deek M.P. A narrative review of genetic biomarkers in non-small cell lung cancer: an update and future perspectives. *AME Med. J*. 2023;8:6. <https://doi.org/10.21037/amj-2022-01>
13. Kalra J., Baker J. Multiplex Immunohistochemistry for Mapping the Tumor Microenvironment. *Methods Mol. Biol*. 2017;1554:237–251. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6759-9\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6759-9_17)
14. Koh J., Kwak Y., Kim J., Kim W.H. High-Throughput Multiplex Immunohistochemical Imaging of the Tumor and Its Microenvironment. *Cancer Res. Treat*. 2020;52(1):98–108. <https://doi.org/10.4143/crt.2019.195>
15. Magaki S., Hojat S.A., Wei B., So A., Yong W.H. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods. Mol. Biol*.

- 2019;1897:289–298. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25)
16. Schildhaus H.U. Immunohistochemistry-based predictive biomarkers for lung cancer. *Pathologie*. 2020;41(1):21–31. <https://doi.org/10.1007/s00292-020-00750-7>
17. VanderLaan P.A., Rangachari D., Majid A., Parikh M.S., Gangadharan S.P., Kent M.S., McDonald D.C., Huberman M.S., Kobayashi S.S., Costa D.B. Tumor biomarker testing in non-small-cell lung cancer: A decade of change. *Lung Cancer*. 2018;116:90–95. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.01.002>
18. Sukswai N., Khoury J.D. Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2019;14(5):368–375. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-00533-9>
19. Villar V.H., Subotički T., Đikić D., Mitrović-Ajtić O., Simon F., Santibanez J.F. Transforming Growth Factor-β1 in Cancer Immunology: Opportunities for Immunotherapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2023;1408:309–328. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-26163-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-031-26163-3_17)
20. Xue V.W., Chung J.Y., Córdoba C.A.G., Cheung A.H., Kang W., Lam E.W., Leung K.T., To K.F., Lan H.Y., Tang P.M. Transforming Growth Factor-β: A Multifunctional Regulator of Cancer Immunity. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11):3099. <https://doi.org/10.3390/cancers12113099>
21. Xiong H., Liu X., Xie Z., Zhu L., Lu H., Wang C., Yao J. Metabolic Symbiosis-Blocking Nano-Combination for Tumor Vascular Normalization Treatment. *Adv. Healthc. Mater.* 2022;11(17):e2102724. <https://doi.org/10.1002/adhm.202102724>

## References:

1. González-Ballesteros MM, Mejía C, Ruiz-Azuara L. Metallodrugs: an approach against invasion and metastasis in cancer treatment. *FEBS Open Bio*. 2022;12(5):880–899. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13381>
2. Peña Q, Wang A, Zaremba O, Shi Y, Scheeren HW, Metselaar JM, Kiessling F, Pallares RM, Wuttke S, Lammers T. Metallodrugs in cancer nanomedicine. *Chem Soc Rev*. 2022;51(7):2544–2582. <https://doi.org/10.1039/d1cs00468a>
3. Syed Annuar SN, Kamaludin NF, Awang N, Chan KM. Cellular basis of organotin(IV) derivatives as anticancer metallodrugs: A Review. *Fron Chem*. 2021;9:657599. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.657599>
4. Milaeva ER, Shpakovsky DB, Gracheva YA, Antonenko TA, Ksenofontova TD, Nikitin EA, Berseneva DA. Novel selective anticancer agents based on sn and au complexes. Mini-review. *Pure and Applied Chemistry*. 2020;92(8):1201–1216. <https://doi.org/10.1515/pac-2019-1209>
5. Milaeva ER, Dodokhova MA, Shpakovsky DB, Antonenko TA, Safronenko A, Kotieva I.M., Komarova EF, Gantsgorn EV, Alkhuseyn-Kulyaginova MS. Mechanisms of the Cytotoxic Action of Organotin Compounds. *Journal Biomed*. 2021;17(2):88–99. (In Russ.). <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-2-88-99>
6. Dodokhova MA, Safronenko AV, Kotieva IM, Sukhorukova NV, Gantsgorn EV, Alkhuseyn-Kulyaginova MS, Komarova EF, Shpakovsky DB, Milaeva ER. Pharmacotherapeutic potential's evaluation of organotin compounds in vivo. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2021;13(3):30–34 (In Russ.). <https://doi.org/10.30906/2073-8099-2021-13-3-30-34>
7. Dodokhova MA, Safronenko AV, Kotieva IM, Komarova EF, Trepel VG, Alkhuseyn-Kulyaginova MS, Shpakovskiy DB, Milaeva ER. Study of acute oral toxicity of organotin compounds containing a 2,6-di-tert-butylphenol fragment. *Ural'skiy medicinskij zhurnal*. 2021;20(3):73–77. (In Russ.). <https://doi.org/10.52420/2071-5943-2021-20-3-73-77>
8. Dodokhova MA, Voronova OV, Kotieva IM, Safronenko AV, Shlyk SV, Drobotya NV, Akimenko MA, Shpakovsky DB, Milaeva ER. Comparative analysis of morphological and biochemical changes after a single intragastric administration of hybrid organotin compounds. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2023;38(1):167–174 (In Russian.). <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2023-38-1-167-174>
9. Dodokhova MA, Safronenko AV, Kotieva IM, Alkhuseyn-Kulyaginova MS, Shpakovsky DB, Milaeva ER. Impact of organotin compounds on the growth of epidermoid Lewis carcinoma. *Research Results in Pharmacology*. 2021;7(4):81–88. <https://doi.org/10.3897/rpharmacology.7.71455>
10. Dodokhova MA, Safronenko AV, Kotieva IM, Alkhuseyn-Kulyaginova MS, Shpakovsky DB, Milaeva ER. Evaluation of the pharmacological activity of hybrid organotin compounds in a B16 melanoma model in the classical and metronomic administration modes. *Research Results in Pharmacology*. 2022;8(1):85–94.
11. Koh J, Kwak Y, Kim J, Kim WH. High-Throughput Multiplex Immunohistochemical Imaging of the Tumor and Its Microenvironment. *Cancer Res. Treat.* 2020;52(1):98–108. <https://doi.org/10.4143/crt.2019.195>
12. Workman S, Jabbour SK, Deek MP. A narrative review of genetic biomarkers in non-small cell lung cancer: an update and future perspectives. *AME Med. J.* 2023;8:6. <https://doi.org/10.21037/amj-2022-01>
13. Kalra J, Baker J. Multiplex Immunohistochemistry for Mapping the Tumor Microenvironment. *Methods Mol Biol*. 2017;1554:237–251. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6759-9\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6759-9_17)
14. Koh J, Kwak Y, Kim J, Kim WH. High-Throughput Multiplex Immunohistochemical Imaging of the Tumor and Its Microenvironment. *Cancer Res Treat.* 2020;52(1):98–108. <https://doi.org/10.4143/crt.2019.195>
15. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:289–298. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25)
16. Schildhaus HU. Immunohistochemistry-based predictive biomarkers for lung cancer. *Pathologie*. 2020;41(1):21–31. <https://doi.org/10.1007/s00292-020-00750-7>
17. VanderLaan PA, Rangachari D, Majid A, Parikh MS, Gangadharan SP, Kent MS, McDonald DC, Huberman MS, Kobayashi SS, Costa DB. Tumor biomarker testing in non-small-cell lung cancer: A decade of change. *Lung Cancer*. 2018;116:90–95. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.01.002>
18. Sukswai N, Khoury JD. Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14(5):368–375. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-00533-9>
19. Villar VH, Subotički T, Đikić D, Mitrović-Ajtić O, Simon F, Santibanez JF. Transforming Growth Factor-β1 in Cancer Immunology: Opportunities for Immunotherapy. *Adv Exp Med Biol*. 2023;1408:309–328. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-26163-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-031-26163-3_17)
20. Xue VW, Chung JY, Córdoba CAG, Cheung AH, Kang W, Lam EW, Leung KT, To KF, Lan HY, Tang PM. Transforming Growth Factor-β: A Multifunctional Regulator of Cancer Immunity. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11):3099. <https://doi.org/10.3390/cancers12113099>
21. Xiong H, Liu X, Xie Z, Zhu L, Lu H, Wang C, Yao J. Metabolic Symbiosis-Blocking Nano-Combination for Tumor Vascular Normalization Treatment. *Adv Healthc Mater*. 2022;11(17):e2102724. <https://doi.org/10.1002/adhm.202102724>



## Сведения об авторах

**Додохова Маргарита Авдеевна**, доктор медицинских наук, заведующая ЦНИЛ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29).

**Вклад в статью:** анализ литературных источников, написание статьи, практические поисковые исследования с помощью перечисленных маркеров.

**ORCID:** 0000-0003-3104-827X,

**Акименко Марина Анатольевна**, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры медицинской биологии и генетики ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29).

**Вклад в статью:** анализ литературных источников, постановка иммуногистохимических реакций.

**ORCID:** 0000-0001-8792-6911

**Воронова Ольга Владимировна**, кандидат медицинских наук, главный врач ГБУ Ростовской области «Патолого-анатомическое бюро» (344015, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Благодатная, д. 170А).

**Вклад в статью:** анализ литературных источников, идея написания статьи, оценка маркеров с практической точки зрения.

**ORCID:** 0000-0003-2976-0794

**Алхусейн-Кулягинова Маргарита Стефановна**, ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29).

**Вклад в статью:** анализ литературных источников, практические поисковые исследования с помощью перечисленных маркеров.

**ORCID:** 0000-0001-5123-5289

**Корниенко Наталья Александровна**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной анатомии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29).

**Вклад в статью:** анализ литературных источников, практические поисковые исследования с помощью перечисленных маркеров.

**ORCID:** 0000-0003-0485-5869

**Гулян Марина Владимировна**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29).

**Вклад в статью:** анализ литературных источников, оформление статьи.

**ORCID:** 0000-0001-6023-8916

**Гюльмамедов Давид Натигович**, лаборант кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29).

**Вклад в статью:** анализ литературных источников, практические поисковые исследования с помощью перечисленных маркеров.

**ORCID:** 0009-0000-9237-6512

**Алашева Милана-Мариат Хайдаровна**, лаборант кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29).

**Вклад в статью:** анализ литературных источников, практические поисковые исследования с помощью перечисленных маркеров.

**ORCID:** 0000-0002-1493-5581

## Authors

**Prof. Margarita A. Dodokhova**, MD, DSc, Professor, Department of Pathological Physiology, Head of the Central Research Laboratory, Rostov State Medical University (29, Nahichevansky Prospekt, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation).

**Contribution:** conceived and designed the study; conducted the experiments; performed the data analysis; wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0003-3104-827X

**Dr. Marina A. Akimenko**, MD, PhD, Assistant Professor, Department of Medical Biology and Genetics, Rostov State Medical University (29, Nahichevansky Prospekt, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation).

**Contribution:** conducted the experiments; performed the data analysis.

**ORCID:** 0000-0001-8792-6911

**Dr. Olga V. Voronova**, MD, PhD, Chief Medical Officer, Regional Department of Pathology (170A, Blagodatnaya Street, Rostov-on-Don, 344015, Russian Federation).

**Contribution:** conceived and designed the study; performed the data analysis; wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0003-2976-0794

**Dr. Margarita S. Alkhusein-Kulyaginova**, MD, Assistant Professor, Department of Pathophysiology, Rostov State Medical University (29, Nahichevansky Prospekt, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation).

**Contribution:** conducted the experiments.

**ORCID:** 0000-0001-5123-5289

**Dr. Natalia A. Kornienko**, MD, PhD, Associate Professor, Department of Normal Anatomy, Rostov State Medical University (29, Nahichevansky Prospekt, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation).

**Contribution:** conducted the experiments.

**ORCID:** 0000-0003-0485-5869

**Dr. Marina V. Gulyan**, MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathophysiology, Rostov State Medical University (29, Nahichevansky Prospekt, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation).

**Contribution:** conceived and designed the study.

**ORCID:** 0000-0001-6023-8916

**Mr. David N. Gyulmamedov**, Laboratory Assistant, Department of Pathophysiology, Rostov State Medical University (29, Nahichevansky Prospekt, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation).

**Contribution:** conducted the experiments.

**ORCID:** 0009-0000-9237-6512

**Mrs. Milana-Mariat Kh. Alasheva**, Laboratory Assistant, Department of Pathophysiology, Rostov State Medical University (29, Nahichevansky Prospekt, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation).

**Contribution:** conducted the experiments.

**ORCID:** 0000-0002-1493-5581

**Mrs. Esmira Sh. Kazimagomedova**, Laboratory Assistant, Department of Pathophysiology, Rostov State Medical University (29, Nahichevansky Prospekt, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation).

**Contribution:** conducted the experiments.

**ORCID:** 0009-0003-3731-6746

**Dr. Dmitry B. Shpakovsky**, PhD, Senior Researcher, Research Laboratory of the Bioelementoorganic Chemistry, Department of Medical Chemistry and Fine Organic Synthesis, Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry (1, b. 3, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation).

**Contribution:** performed the chemical synthesis of tested compounds.

**ORCID:** 0000-0002-7824-3382

**Dr. Elena R. Milaeva**, DSc, Professor, Head of the Department of Medical Chemistry and Fine Organic Synthesis, Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry (1, b. 3, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation).

**Казимагомедова Эсмира Шихмагомедовна**, лаборант кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29).

**Вклад в статью:** анализ литературных источников, практические поисковые исследования с помощью перечисленных маркеров.

**ORCID:** 0009-0003-3731-6746

**Шпаковский Дмитрий Борисович**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, научно-исследовательская лаборатория биоэлементоорганической химии кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3).

**Вклад в статью:** синтез тестируемых соединений.

**ORCID** 0000-0002-7824-3382

**Милаева Елена Рудольфовна**, доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой медицинской химии и тонкого органического синтеза ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3).

**Вклад в статью:** синтез тестируемых соединений.

**ORCID:** 0000-0002-5489-3866

**Котиева Инга Мовлиевна**, доктор медицинских наук, профессор, проректор по научной работе, заведующая кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (344022, Россия, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29).

**Вклад в статью:** анализ литературных источников, идея написания статьи.

**ORCID:** 0000-0002-2796-9466

**Contribution:** performed the chemical synthesis of tested compounds.

**ORCID:** 0000-0002-5489-3866

**Prof. Inga M. Kotieva**, MD, DSc, Professor, Chief Scientific Officer, Chief of the Department of Pathophysiology, Rostov State Medical University (29, Nahichevansky Prospekt, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation).

**Contribution:** conceived and designed the study; wrote the manuscript.

**ORCID:** 0000-0002-2796-9466

Статья поступила: 16.09.2023 г.

Поступила после доработки: 01.07.2024 г.

Принята в печать: 30.08.2024 г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 16.09.2023

Received in revised form: 01.07.2024

Accepted: 30.08.2024

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.