

Смирнова Г.Б.<sup>1</sup>, Цуркан С.А.<sup>2</sup>, Борисова Ю.А.<sup>1</sup>, Черкасова Ж.Р.<sup>2</sup>, Романенко В.И.<sup>1</sup>, Калишьян М.С.<sup>1</sup>, Трещалина Е.М.<sup>1</sup>

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *IN VIVO* ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА С РАЗЛИЧНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ РЕЦЕПТОРА RECAF К АФП-СОДЕРЖАЩЕМУ КОМПЛЕКСУ АИМПИЛА

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup>ООО «ФНЦ "ФармАксес"», 127322, г. Москва, Россия

Проведены эксперименты с нековалентным комплексом АИМПИЛА, направленным на рецепторы альфа-фетопротейна (ReCAF). Использованы подкожные ксенографты опухолей человека с разным содержанием ReCAF, трансплантированные иммунодефицитным мышам Balb/c nude: рака ободочной кишки SW620/ReCAF<sup>+</sup>, рака печени HepG2/ReCAF<sup>++</sup> и рака молочной железы T47D/ReCAF<sup>+++</sup>. АИМПИЛА вводили начиная с 4-го дня после перевивки опухоли перорально ежедневно 5- или 10-кратно в суммарных дозах 0,5–2,0 мг/кг или 1,0–4,0 мг/кг соответственно. Показано, что ингибирование роста опухоли (критерий T/C < 42%) под действием АИМПИЛА возрастает в зависимости от содержания ReCAF: T/C = 70% (SW620/ReCAF<sup>+</sup>), T/C = 51% (HepG2/ReCAF<sup>++</sup>) и T/C = 22% (T47D/ReCAF<sup>+++</sup>). На наиболее чувствительной модели в серии опытов как оптимальный определен 10-кратный курс введения в суммарной дозе 4,0 мг/кг, позволяющий получить T/C = 15–37% ( $p < 0,05$ ). При патоморфологическом исследовании срезов T47D/ReCAF<sup>+++</sup> верифицирована гибель большинства опухолевых клеток под действием АИМПИЛА через механизм апоптоза.

Ключевые слова: нековалентный комплекс АИМПИЛА; подкожные ксенографты человека; иммунодефицитные мыши; эффективность.

**Для цитирования:** Смирнова Г.Б., Цуркан С.А., Борисова Ю.А., Черкасова Ж.Р., Романенко В.И., Калишьян М.С., Трещалина Е.М. Чувствительность *in vivo* опухолей человека с различной экспрессией рецептора RECAF к АФП-содержащему комплексу аимпила. *Российский онкологический журнал*. 2017; 22 (5): 288–291. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-5-288-291>

**Для корреспонденции:** Смирнова Галина Борисовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник Лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24. E-mail: [gsmir53@yandex.ru](mailto:gsmir53@yandex.ru).

Smirnova G.B.<sup>1</sup>, Tsurkan S.A.<sup>2</sup>, Borisova Yu.A.<sup>1</sup>, Tcherkassova J.R.<sup>2</sup>, Romanenko V.I.<sup>1</sup>, Kalishian M.S.<sup>1</sup>, Treshalina H.M.<sup>1</sup>  
SENSITIVITY OF HUMAN TUMORS WITH VARIOUS EXPRESSION OF RECAF RECEPTOR TO AFP-CONTAINING COMPLEX OF AIMPILA *IN VIVO*

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478, Russian Federation;

<sup>2</sup>Pharmaceutical Research Center «Pharmaccess», Moscow, 127322, Russian Federation

Experimental studies were carried out with non-covalent complex AIMPILA targeting on AFP receptors (ReCAF). The human subcutaneous xenografts were used with different ReCAF containing transplanted to immunodeficient mice Balb/c nude: colon cancer SW620/ReCAF<sup>+</sup>, liver cancer HepG2/ReCAF<sup>++</sup> and breast cancer T47D/ReCAF<sup>+++</sup>. AIMPILA was administrated per os under beginning on 4<sup>th</sup> day after tumor transplantation daily for 5 or 10 days in the total doses of 0.5–2.0 mg/kg or 1.0–4.0 mg/kg, accordingly. The inhibiting effect ( $T/C \leq 42\%$ ) of AIMPILA was shown to increase in dependence on ReCAF containing on tumor cells:  $T/C = 70\%$  (SW620/ReCAF<sup>+</sup>);  $T/C = 51\%$  (HepG2/ReCAF<sup>++</sup>) and  $T/C = 22\%$  (T47D/ReCAF<sup>+++</sup>). On the more sensitive model in a series of experiences 10-times course for the treatment with the total dose of 4.0 mg/kg was detected and revealed to  $T/C = 15–37\%$  ( $p < 0.05$ ). In the pathomorphological investigation of the T47D/ReCAF<sup>+++</sup> tumor there was verified the death of the majority of tumor cells under the treatment of AIMPILA via the apoptosis pathway.

Key words: non-covalent complex AIMPILA; ReCAF; efficacy; subcutaneous human tumor xenografts; nude mice.

**For citation:** Smirnova G.B., Tsurkan S.A., Borisova Yu.A., Tcherkassova J.R., Romanenko V.I., Kalishian M.S., Treshalina H.M. Sensitivity of human tumors with various expression of RECAF receptor to AFP-containing complex of AIMPILA *in vivo*. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*. (Russian Journal of Oncology). 2017; 22 (5): 288–291. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2017-22-5-288-291>

**For correspondence:** Galina B. Smirnova, MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Combination Therapy of Tumors of the Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, Moscow, 115478, Russian Federation. E-mail: [gsmir53@yandex.ru](mailto:gsmir53@yandex.ru).

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

**Acknowledgment.** The work has no sponsorship.

Received 29 May 2017

Accepted 22 June 2017

Препарат АИМПИЛА представляет собой запатентованный в России нековалентный комплекс, состоящий из транспортного белка альфа-фетопротейна (АФП) с онкоспецифичным гликозилированием и цитостатической группы, индуцирующей апоптоз. Препарат пероральный, направлен на рецепторы

АФП (receptor alfa fetoprotein, ReCAF) и ориентирован соответственно государственному контракту №13411.1008799.13.166 от 31.07.2013 на лечение колоректального, в том числе метастазирующего, рака [«Трансфер зарубежных разработок лекарственного средства на основе нековалентного комплекса транс-

портного белка, обладающего онкоспецифичным гликозилированием, и агента, индуцирующего апоптоз раковых клеток, для лечения колоректального, в том числе метастазирующего, рака, и проведение его доклинических и клинических исследований». Шифр «2.3 Белковый комплекс 2013». Нековалентные комплексы, особенно с цитостатической группой, рекомендованы для введения в желудок [1]. Для АИМПИЛА нами показано, что при пероральном введении крысам он интернализуется в тонкой кишке [2]. Препарат оказался неактивным *in vitro* и *in vivo* на опухолевых моделях, не содержащих рецепторы АФП [3]. Действие АИМПИЛА на рост ReCAF-положительных опухолей человека ранее не изучали. Соответственно исследования проведены на трёх штаммах подкожных (п/к) ксенографтов опухоли человека с разным содержанием ReCAF: рака ободочной кишки SW620/ReCAF<sup>+</sup>, рака печени HepG2/ReCAF<sup>+</sup> и рака молочной железы T47D/ReCAF<sup>+++</sup>.

### Материал и методы

**Иммунодефицитные мыши.** Для экспериментов с п/к ксенографтами использованы 8-недельные половозрелые мыши-самки и самцы Balb/c nude массой 20–22 г из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» [4]. Мышей содержали в условиях специализированного кондиционированного вивария ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» в макролоновых клетках с твердым основанием, аксессуарными и аэросистемой (бумажный фильтр, бутылка внутри, Cage Type II – Hood of open design) фирмы «ЕНHREТGNBA» (Германия) со свободным доступом к воде. В день начала опыта всех мышей взвешивали на электронных весах MW-Tseries, User's Manual («CAS», США), цена деления 0,01 г под контролем стандартной динамики прироста массы. Для введения в эксперимент мышей перед началом лечения делили на группы по 8–10 особей.

**Опухолевые модели.** Использовали линию перевиваемого рака молочной железы человека, штамм T47D (исходная линия клеток из ATCC® Cat. No HTB-133™), перевиваемого рака ободочной кишки, штамм SW620 (исходная линия клеток из ATCC® Cat. No CCL-227™) и рака печени человека, штамм HepG2 (исходная линия из ATCC® Cat. No HB-8065™). Штаммы опухолей и культуру клеток получали из Коллекции опухолевых штаммов человека РОНЦ им. Н.Н. Блохина [5]. Трансплантацию опухоли выполняли мышам – самкам или самцам Balb/c nude под кожу бока по 40 мг опухолевой ткани в 0,5 мл питательной среды 199. Клеточную суспензию имплантировали мышам под кожу бока по 0,2 мл, что составляло 12·10<sup>6</sup> опухолевых клеток на мышь.

**Исследуемый препарат.** АИМПИЛА в виде 5% (50 мг/мл) стокового раствора вводили в желудок металлическим зондом 5–10-кратно ежедневно в диапазоне суммарных доз от 1,0 до 4,0 мг/кг. Дозы препарата рассчитаны индивидуально на мышь. Лечение начинали через 48 ч после перевивки. Мыши контрольных групп получали соответствующий растворитель в адекватном объеме и режиме применения.

**Оценка эффективности лечения.** После окончания лечения у всех мышей трехкратно измеряли объемы опухолей, на каждый срок рассчитывали средний объем по формуле:

$$V_{ср} = a \cdot b \cdot c.$$

Для ксенографтов использован стандартный критерий T/C < 42% (treatment/control), рассчитанный по соотношению средних объемов опухолей [6].

**Патоморфологическое исследование.** Под контролем ряда показателей лечебного патоморфоза (ЛП) в сравнении с опухолью без лечения (контроль) исследованию подвергнуты срезы опухолевых узлов T47D/ReCAF<sup>+++</sup> от мышей, получавших АИМПИЛА в суммарной дозе 1,0 мг/кг. Исследованы образцы опухолей (n = 18), взятые от мышей на 12-е сутки после окончания эффективного лечения АИМПИЛА (n = 9) и от контрольных мышей на 18-е сутки роста (КРО) (n = 9). С помощью стандартной гистологической окраски при световой микроскопии изучены следующие морфологические особенности опухоли: структура, показатели программированной и некротической гибели клеток, пролиферативная активность и степень полиформизма.

**Оценка переносимости воздействия.** Проведена по состоянию и поведению мышей в процессе эксперимента, следили за гибелью от токсичности.

**Статистическая обработка результатов.** Результаты исследования подвергнуты статистической обработке путём расчёта критерия t Стьюдента с помощью компьютерных программ Excel 2013 и Excel для Windows 2007. Значимыми считали различия при p < 0,05. Расчетные статистические величины приведены в таблицах.

**Завершение экспериментов.** После завершения экспериментов животных умерщвляли посредством передозировки эфирного наркоза при соблюдении гуманных методов обращения, принятых в РФ. Павших или умерщвлённых мышей с соблюдением гуманных методов подвергали аутопсии для выявления визуальных патологических изменений внутренних органов [7, 8].

### Результаты

#### T47D/ReCAF<sup>+++</sup>

Показано, что п/к ксенографты без лечения в группе КРО растут достаточно быстро, опухолевые узлы увеличивались в период наблюдения более чем в 10 раз. АИМПИЛА при всех изученных суммарных дозах в режиме 5-кратного лечения (рис. 1) вызывал достоверное (p < 0,05), но кратковременное ингибирование роста T47D только в 1-е сутки после окончания лечения. Эффективность при суммарных дозах 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг на этот срок составила T/C = 33%, T/C = 44% и T/C = 18% соответственно. Переносимость 5-кратного курса

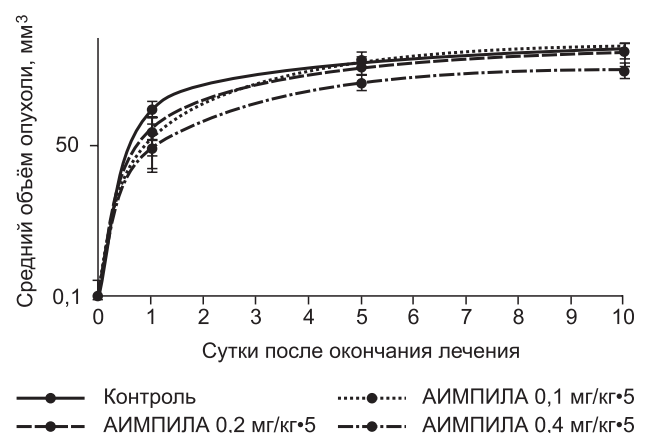


Рис. 1. Динамика роста T47D под действием 5-кратного курса лечения АИМПИЛА в суммарных дозах от 0,5 до 2,0 мг/кг.

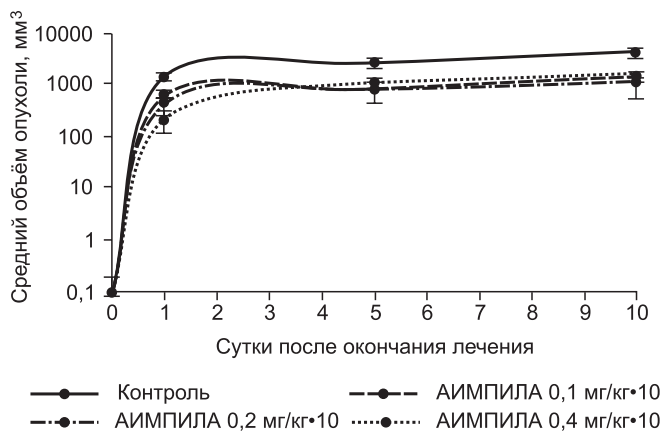


Рис. 2. Динамика роста T47D под действием 10-кратного курса лечения АИМПИЛА в диапазоне суммарных доз от 1,0 до 4,0 мг/кг.

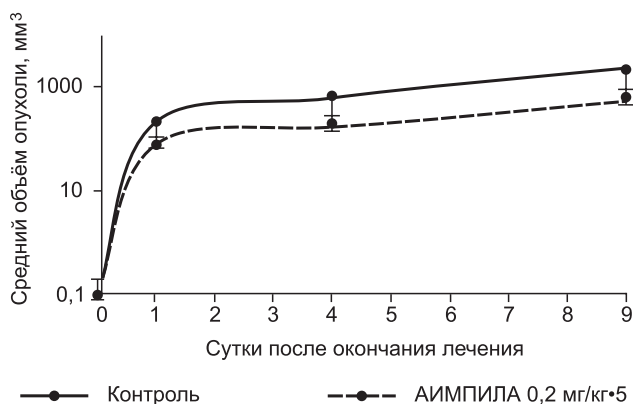


Рис. 3. Эффективность перорального АИМПИЛА в суммарной дозе 1 мг/кг при 5-кратном курсе лечения п/к ксенографтов рака печени человека HepG2.

лечения АИМПИЛА была удовлетворительной во всех случаях без побочных эффектов. Данные на T47D, полученные при 10-кратном курсе лечения АИМПИЛА в трех суммарных дозах от 1,0 до 4,0 мг/кг, представлены на рис. 2. Видно, что оценка эффективности лечения выполнена в более поздние сроки роста опухолевых узлов, размеры которых к началу измерений были больше исходных в 6,6 раза и увеличивались в период наблюдения в 2,8 раза. На этом фоне при применении АИМПИЛА в суммарных дозах 1,0–2,0–4,0 мг/кг при 10-кратном лечении получен достоверный ( $p < 0,05$ ) противоопухолевый эффект во все сроки после окончания лечения. Соответственно ингибирование роста достигло Т/С = 37–43%, Т/С = 26–32% и Т/С = 15–37% в прямой зависимости от величины суммарной дозы. Переносимость 10-кратного курса лечения АИМПИЛА была удовлетворительной без побочных эффектов.

#### HepG2/ReCAF<sup>++</sup>

АИМПИЛА вводили мышам 5-кратно (2–6-е сутки после трансплантации) в разовой дозе 0,2 мг/кг, суммарно 1,0 мг/кг. Наблюдение продолжали в течение 21 сут после трансплантации опухоли с трёхкратным измерением опухолевых узлов. Результаты исследования приведены на рис. 3.

На представленной иллюстрации видно, что п/к ксенографты HepG2 без лечения растут достаточно быстро, и начиная с 15-х суток после трансплантации опухолевые узлы увеличиваются в 10 раз в течение 3 нед после трансплантации. В группе мышей, получившей АИМПИЛА, наблюдали недостоверное ингибирование роста опухоли,  $V_{ср} = 19,9 \pm 14,3 \text{ мм}^3$  против  $V_{ср} = 39,3 \pm 30,1 \text{ мм}^3$  в 1-е сутки,  $V_{ср} = 112,9 \pm 97,2 \text{ мм}^3$  против  $V_{ср} = 70,4 \pm 46,0 \text{ мм}^3$  на 3-и сутки и  $V_{ср} = 247,7 \pm 147,9 \text{ мм}^3$  против  $V_{ср} = 386,86 \pm 329,78 \text{ мм}^3$  ( $p > 0,05$ ) на 7-е сутки после окончания лечения. Соответственно Т/С = 50, 62 и 64% ( $p > 0,05$ ). Переносимость лечения АИМПИЛА была удовлетворительной без побочных эффектов. Таким образом, АИМПИЛА в разовой дозе 0,2 мг/кг при ежедневном пероральном введении в течение 5 дней (суммарно 1,0 мг/кг) вызывает недостоверный противоопухолевый эффект на уровне Т/С = 50–64% ( $p = 0,05–0,1$ ) на п/к ксенографтах рака печени человека HepG2.

#### SW620/ReCAF<sup>+</sup>

АИМПИЛА в разовых дозах 0,1, 0,2 и 0,4 мг/кг (суммарно 1,0, 2,0 и 4,0 мг/кг) вводили мышам ежедневно на 4–14-е сутки после трансплантации опухоли. Наблюдение продолжали в течение 7 сут после окончания лечения с двукратным измерением опухолевых узлов. П/к ксенографты рака ободочной кишки человека SW620 без лечения на 11-е сутки после трансплантации достигли объема  $V_{ср} = 1565 \pm 677 \text{ мм}^3$  и  $V_{ср} = 2747 \pm 1061 \text{ мм}^3$  к окончанию опыта. Под действием 10-кратного курса АИМПИЛА в диапазоне доз значимый противоопухолевый эффект не достигнут, Т/С = 70–88%. При этом в 1-е и 5-е сутки после окончания лечения независимо от величины применённой дозы размеры опухолей были все же достоверно меньше контрольных, Т/С = 70–72% ( $p < 0,05$ ). Переносимость лечения была удовлетворительной (рис. 4, табл. 1).

#### Патоморфологическая картина T47D/ReCAF<sup>+++</sup>

Показано, что в опухоли под действием АИМПИЛА на фоне значимого ингибирования её роста (в группе АИМПИЛА) при снижении пролиферативной активности и степени клеточного полиморфизма в опухоли многократно и достоверно ( $p = 0,000$ ) усилены процессы апоптоза и некроза. В группе АИМПИЛА в сравнении с группой КРО (табл. 2):

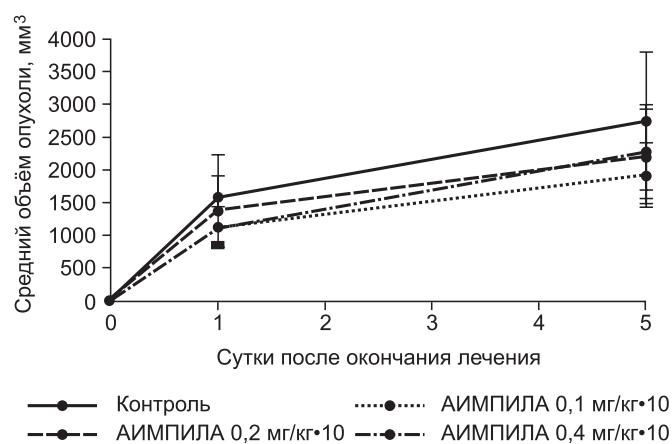


Рис. 4. Динамика роста SW620 под действием 10-кратного курса лечения АИМПИЛА в диапазоне суммарных доз от 1,0 до 4,0 мг/кг

Таблица 1  
Чувствительность п/к ксенографтов T47D, HepG2 и SW620 с различной экспрессией ReCAF к АИМПИЛА

Группа	Разовая доза, мг/кг	Режим введения, дни	Суммарная доза, мг/кг	T/C, %, через 8 дней после лечения*
Контроль	0,2 мл	–	–	100
<i>T47D/ReCAF + + +</i>				
АИМПИЛА	0,1–0,4	5	0,5–2,0	18–44
АИМПИЛА	0,1–0,4	10	1,0–4,0	15–37
<i>HepG2/ReCAF + +</i>				
АИМПИЛА	0,2	5	1,0	50–64
<i>SW620/ReCAF +</i>				
АИМПИЛА	0,1–0,4	10	1,0–4,0	70–88

Примечание. \* – стандартный критерий эффективности T/C ≤ 42% (treatment/control × 100%).

Таблица 2  
ЛП в п/к ксенографтах рака молочной железы человека T47D у мышей-самок Balb/c nude под действием АИМПИЛА 1,0 мг/кг

Группы, n = 9	Морфологические показатели ЛП				площадь некрозов, %
	диаметр поперечного среза опухоли, см	клетки с признаками		степень полиморфизма	
		митоза, %	апоптоза, %		
АИМПИЛА	0,67 ± 0,1	0,39 ± 0,09	1,8 ± 0,12	+	24,1 ± 1,23
КРО	1,6 ± 0,17	2,8 ± 0,24	0,29 ± 0,04	++	12,3 ± 0,45

- средний диаметр среза 0,67 ± 0,1 см против 1,6 ± 0,17 см (уменьшение в 2,4 раза);
- количество клеток в митозе 0,39 ± 0,09% против 2,8% (уменьшение в 9,6 раза);
- количество клеток с признаками апоптоза 1,8 ± 0,16% против 0,29% (увеличение в 6,2 раза);
- зона некротического поражения 24,1% против 12,1% (увеличение в 2 раза);
- двукратное уменьшение степени полиморфизма.

### Заключение

Полученные количественные данные являются морфологическим подтверждением ингибирующего действия АИМПИЛА на рост п/к ксенографтов. Индукцию апоптоза и блокирование митоза, показавших многократную положительную антипролиферативную динамику под действием АИМПИЛА, можно обсуждать в качестве возможных механизмов ингибирования.

Эксперименты проведены с нековалентным комплексом АИМПИЛА, направленным на рецепторы АФП (ReCAF). Использованы подкожные ксенографты опухолей человека с разным содержанием ReCAF, трансплантированные иммунодефицитным мышам Balb/c nude: рак ободочной кишки SW620/ReCAF<sup>+</sup>, рак печени HepG2/ReCAF<sup>++</sup> и рак молочной железы T47D/ReCAF<sup>+++</sup>. АИМПИЛА вводили, начиная на 4-й день после пероральной опухоли, перорально ежедневно 5-тикратно или 10-тикратно в суммарных дозах 0,5–2,0 мг/кг или 1,0–4,0 мг/кг, соответственно. Показано, что ингибирование роста опухоли (критерий T/C < 42%) под действием АИМПИЛА возрастает в зависимости от содержания ReCAF: T/C = 70% (SW620/ReCAF<sup>+</sup>), T/C = 51% (HepG2/

ReCAF<sup>++</sup>) и T/C = 22% (T47D/ReCAF<sup>+++</sup>). На наиболее чувствительной модели в серии опытов как оптимальный определен 10-кратный курс введения в суммарной дозе 4,0 мг/кг, позволяющий получить T/C = 15–37% (p < 0,05). При патоморфологическом исследовании срезов T47D/ReCAF<sup>+++</sup> верифицирована гибель большинства опухолевых клеток под действием АИМПИЛА через механизм апоптоза.

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

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Пак В. Композиция альфа-фетопротейна и индукторов апоптоза для лечения рака. Патент РФ, №2438695; 2012.
2. Андропова Н.В., Черкасова Ж.Р., Цуркан С.А., Смирнова Г.Б., Трещалина Е.М. Оценка интернализации АФП-содержащего нековалентного комплекса АИМПИЛА в модели изолированного отрезка толстой кишки крыс. *Российский онкологический журнал*. 2016; 21(6): 308–11.
3. Трещалина Е.М., Цуркан С.А., Черкасова Ж.Р., Лесная Н.А. Роль рецептора альфафетопротейна в разработке таргетных препаратов для онкологической патологии. *Российский онкологический журнал*. 2017; 1(22): 4–14.
4. Трещалина Е.М. *Иммунодефицитные мыши разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможности использования*. М.: Издательская группа РОНЦ; 2010.
5. Трещалина Е.М. *Коллекция опухолевых штаммов человека* / Под ред. М.И. Давыдова. М.: 2009.
6. Трещалина Е.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. М.: изд. Гриф и К. 2012; 39: 642–57.
7. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, ЕЭС, Страсбург. *Ланималогия*. 1993; 1: 29.
8. Большаков, О.П. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. ВОЗ. 2000. Рекомендации комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. *Качественная клиническая практика*. 2002; 9: 1–15.

### REFERENCES

1. Pak V. Song alpha-fetoprotein and Inducers of apoptosis to treat cancer. Patent RF, №2438695; 2012. (in Russian)
2. Andronova N.V., Cherkasova Zh.R., Turcan S.A., Smirnova G.B., Treschalina H.M. Evaluation of the internalization of AFP-containing non-covalent co-plex of AMPILA in the model of an isolated segment of the large intestine of rats. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*. 2016; 21(6): 308–11. (in Russian)
3. Treschalina H.M., Tsurkan S.A., Cherkasova Zh.R., Lesnaya N.A. The role of the receptor of alfa-fetoprotein in the development of targeted drugs for oncological pathology. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal*. 2017; 1(22): 4–14. (in Russian)
4. Treschalina H.M. *Immunodefitsitnye mice breeding RNTS im.NN Blohin RAMS. Possibilities of use*. Moscow: Izdatel'skaya gruppa RONC; 2010. (in Russian)
5. Treschalina H.M. *Collection of human tumor strains*. / Ed. M.I. Davydov. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2009. (in Russian)
6. Treschalina H.M. Methodical recommendations on preclinical study of antitumor activity of drugs. In: *The guidelines for preclinical studies of pharmaceuticals. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. Moscow: Grif i K. 2012; 39: 642–57. (in Russian)
7. European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Experimental and Other Scientific Purposes, EEC, Strasbourg. *Lanimalogiya*. 1993; 1: 29.
8. Bolshakov O.P. Didactic and ethical aspects of research on biomodels and laboratory animals. WHO. 2000. Recommendations to ethics committees conducting an examination of biomedical research. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika*. 2002; 9: 1–15. (in Russian)

Поступила 29.05.17  
Принята к печати 22.06.17