

© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.24-006.6:615.277.3]-092.9

**Филимонова М.В., Южаков В.В., Филимонов А.С., Макаrchук В.М.,
Бандурко Л.Н., Корнеева Т.С., Самсонова А.С., Цыганова М.Г.,
Шевченко Л.И., Севаньякаева Л.Е., Фомина Н.К., Ингель И.Э., Яковлева Н.Д.**

Сравнительное исследование влияния ингибитора NOS T1023 и бевацизумаба на рост и морфологию карциномы легких Льюис

Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, 249036, Калужская область, г. Обнинск, Россия, ул. Королева, д. 4

Цель исследования – изучение механизмов противоопухолевой активности ингибитора NOS T1023 и оценка перспективности его дальнейшей разработки.

Методика. В качестве опухолевой модели использована эпидермоидная КЛЛ, штамм которой получен из банка опухолевых материалов ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина и поддерживался на самцах мышей $C_{57}BL_{6j}$. КЛЛ трансплантировали самцам мышей F_1 ($CBA \times C_{57}BL_{6j}$) путем подкожного введения $1,5 \times 10^6$ клеток карциномы в 0,1 мл суспензии на основе среды 199 в область латеральной поверхности правого бедра. Для сравнительной оценки противоопухолевой эффективности использовали ингибитор NOS под шифром T1023, синтезированный в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба, и VEGF-ингибитор бевацизумаб (БВ3). Животным первой опытной группы ежедневно, со 2 по 20 сутки вводили соединение T1023 (60 мг/кг, в/б); второй опытной группы – трижды, на 2, 5 и 10 сут вводили БВ3 (12 мг/кг, в/б); третьей опытной группы – по этим схемам и в таких же дозах вводили и T1023, и БВ3 (при комбинированном применении T1023 вводили через 4 ч после введения БВ3). Контрольным животным в качестве плацебо со 2 по 20 сутки вводили 0,9% раствор натрия хлорида (0,2 мл, в/б). Противоопухолевые эффекты оценивали, сравнивая размеры опухолевых узлов, длительность задержки роста и индекс торможения роста опухоли у контрольных и опытных животных. Гистологические методы исследования включали иммуноокрашивание на PCNA, CD31, пимонидазол и морфометрический анализ микроскопических изображений.

Результаты сравнительных исследований показали, что соединение T1023 и VEGF-ингибитор бевацизумаб (БВ3) оказывают однонаправленное влияние на карциному легких Льюис (КЛЛ), сопровождающееся торможением роста и подавлением метастазирования неоплазии. Воздействие и T1023, и БВ3 вызывало снижение содержания сосудов в перитуморальных зонах и в «горячих точках» ангиогенеза, усиливало гипоксию паренхимы КЛЛ и стимулировало апоптоз опухолевых клеток. При комбинированном применении T1023 и БВ3 их антинеопластическая эффективность в отношении ингибирования ангиогенеза и девитализации опухолевых клеток соответствовала аддитивному действию.

Заключение. Результаты позволяют предполагать, что основой противоопухолевой активности T1023 является антиангиогенное действие и свидетельствуют о перспективности применения ингибиторов NOS в ангиостатической терапии солидных злокачественных новообразований в сочетании с имеющимися антинеоваскулярными средствами.

Ключевые слова: производные изотиомочевины; ингибиторы NOS; антиангиогенное действие; противоопухолевое действие.

Для цитирования: Филимонова М.В., Южаков В.В., Филимонов А.С., Макаrchук В.М., Бандурко Л.Н., Корнеева Т.С., Самсонова А.С., Цыганова М.Г., Шевченко Л.И., Севаньякаева Л.Е., Фомина Н.К., Ингель И.Э., Яковлева Н.Д. Сравнительное исследование влияния ингибитора NOS T1023 и бевацизумаба на рост и морфологию карциномы легких Льюис. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63(2): 89-98.

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.89-98

Для корреспонденции: Филимонова Марина Владимировна, доктор биол. наук, зав. лаб. радиационной фармакологии, e-mail: mari_fil@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.03.2018

Filimonova M.V., Yuzhakov V.V., Filimonov A.S., Makarchuk V.M., Bandurko L.N., Korneeva T.S., Samsonova A.S., Tsyganova M.G., Shevchenko L.I., Sevankaeva L.E., Fomina N.K., Ingel I.E., Yakovleva N.D.

COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTS OF NOS INHIBITOR T1023 AND BEVACIZUMABUM ON GROWTH AND MORPHOLOGY OF LEWIS LUNG CARCINOMA

A.Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of Russia; 4, Korolev st., Obninsk, Kaluga region, 249036, Russia

The aim. Study of mechanisms of NOS inhibitor T1023 antitumor activity and estimation of its prospects for further development.

Methods. Epidermoid Lewis lung carcinoma (LLC) from N.N. Blokhin NMRCO bank of tumor materials was used as a tumor model. Maintenance of tumor cell culture was provided by intramuscular injection of tumor cells suspension to C57BL6j mice every 14 days. Then LLC cells were transplanted to male F1 mice (CBA`C57BL6j) by subcutaneous injection of $1,5 \times 10^6$ cells in 0,1 ml of 199 medium into the lateral surface of the right hip. Comparative studies of antitumor efficacy were carried out using NOS inhibitor T1023, synthesized in the laboratory of radiation pharmacology of A.F. Tsyb MRRC, and VEGF inhibitor Bevacizumab (BVZ). Mice from the first experimental group were injected intraperitoneally (ip) with compound T1023 at dose 60 mg / kg from day 2 to 20; animals from the second experimental group were treated with BVZ at dose 12 mg / kg ip at days 2, 5 and 10; the third experimental group received T1023 in combination with BVZ according to these schemes and at the same doses (T1023 was administered 4 hours after administration of BVZ). Mice from the control group received 0,9% sodium chloride solution (0,2 ml, ip) as a placebo daily from 2 to 20 days. Antitumor effects were assessed by comparing the tumor size, duration of tumor growth delay and the index of tumor growth inhibition in control and experimental groups. Histological examination methods included immunostaining on PCNA, CD31, pimonidazole and morphometric analysis of microscopic images. **Results.** Comparative studies have shown that compound T1023 and VEGF inhibitor Bevacizumab (BVZ) have unidirectional effects on Lewis lung carcinoma (LLC), accompanied by growth inhibition and suppression of metastasis of neoplasia. The effect of both T1023 and BVZ caused a decrease in vascular content in the peritumoral zones and in the "hot spots" of angiogenesis, increased the hypoxia in the LLC parenchyma, and stimulated apoptosis of tumor cells. The combined use of T1023 and BVZ, caused the antineoplastic efficacy against inhibition of angiogenesis and devitalization of tumor cells which was estimated as additive effect. **Conclusion.** The results suggest that the basis of antitumor activity of T1023 is the anti-angiogenic effect and indicate the prospects of using NOS inhibitors in the angiostatic therapy of solid malignant neoplasms in combination with available anti-neovascular agents.

Keywords: isothiourea derivatives; inhibitors of NOS; antiangiogenic action; antitumor activity.

For citation: Filimonova M.V., Yuzhakov V.V., Filimonov A.S., Makarchuk V.M., Bandurko L.N., Korneeva T.S., Samsonova A.S., Tsyganova M.G., Shevchenko L.I., Sevankaeva L.E., Fomina N.K., Ingel I.E., Yakovleva N.D. Comparative study of the effects of inhibitor NOS T1023 and bevacizumabum on growth and morphology of Lewis lung carcinoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2019; 63(2): 89-98. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02. 89-98

For correspondence: Marina V. Filimonova, Doctor of Biological Science, Head of Laboratory of Radiation Pharmacology of A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of Russia; 4, Korolev st., Obninsk, Kaluga region, 249036, Russian Federation, e-mail: mari_fil@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Filimonova M. V., <https://orcid.org/0000-0002-9690-4746>

Filimonov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-4398-1764>

Makarchuk V.M., <https://orcid.org/0000-0001-6066-1415>

Korneeva T.S., <https://orcid.org/0000-0001-6398-7947>

Samsonova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-7703-0393>

Received 14.03.2018

Введение

По современным представлениям, в регуляции неопластической васкуляризации способны принимать участие многие проангиогенные факторы (VEGF, FGF-2, PIGF, PDGF, IL-8, TGF β , Angs и др.) и эндогенные ингибиторы ангиогенеза (TSP-1, ангиостатин, эндостатин и др.), которые выделяются опухолевыми или стромальными клетками, или мобилизуются из

внеклеточного матрикса [1, 2]. Такая организация опухолевого ангиогенеза предоставляет значительное число мишеней для терапии, но, в то же время, множественность ангиогенных путей расширяет возможности адаптации неоплазий к ангиостатическим воздействиям [3, 4]. Развитие резистентности опухолей наблюдается не только к селективным антиангио-

генным препаратам. Блокирующие сразу несколько ангиогенных рецепторов ингибиторы тирозинкиназы также далеко не всегда позволяют достичь значимой старваии опухоли и длительной ремиссии [5, 6].

В таких условиях перспективным может быть применение ангиостатических средств, направленных на общие участки проангиогенных путей различных факторов. Авторы исследований опухолевого ангиогенеза среди множества модуляторов особую роль отводят эндогенному оксиду азота [7-9]. Действие большинства опухолевых проангиогенных факторов вызывает повышение активности NOS/cGMP-пути в клетках эндотелия, вследствие стимуляции экспрессии и каталитической активности eNOS, что инициирует нисходящий каскад процессов, ведущих к снижению тонуса и росту проницаемости сосудов, стимуляции пролиферации и миграции клеток эндотелия, обеспечивающих формирование новой сосудистой сети. В этой связи неспецифическое антинеоваскулярное действие, по нашему мнению, можно достичь при подавлении эндогенного синтеза NO ингибиторами NOS.

В лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ им. А.Ф. Цыба в последние годы получен ряд оригинальных N,S-замещённых изотиомочевин (ИТМ), являющихся конкурентными ингибиторами NOS, среди которых выделяется производное T1023 (гидробромид 1-изобутаноил-2-изопропил-ИТМ), обладающее селективностью к eNOS и iNOS (ИК₅₀ nNOS/iNOS/eNOS – 47,5/3,2/5,1 мкмоль)¹. В первом исследовании противоопухолевой активности этого соединения нами было показано, что T1023 при субхроническом введении в дозе 60 мг/кг (~1/4 ЛД₁₀) вызывает значительное (на 45–75%) торможение роста и подавление (на 45–80%) процессов метастазирования карциномы лёгких Льюис (КЛЛ), сопровождающееся 3-кратным повышением индекса апоптоза опухолевых клеток [10]. В данной работе, которая выполнена в рамках тем государственного задания МРНЦ им. А.Ф. Цыба за 2015-2017 гг. [11], с целью изучения механизмов противоопухолевой активности соединения T1023 и оценки перспективности его дальнейшей разработки проведено сравнительное исследование влияния на рост, метастазирование и функциональную морфологию КЛЛ этого ингибитора NOS и VEGF-ингибитора бевацизумаба (БВЗ).

¹Проскуряков С.Я., Верховский Ю.Г., Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Мандругин А.А., Трофимова Т.П. и др. Антигипотензивное средство. Патент на изобретение RU 2353614. 06.11.2007. Филимонова М.В., Шевченко Л.И., Макачук В.М., Шевчук А.С., Южаков В.В., Цыб А.Ф. Противоопухолевое средство. Патент на изобретение RU 2503450. 19.04.2012.

Методика

Лабораторные животные. Исследования проведены на самцах мышей-гибридов F₁ (СВА'С₅₇BL_{6j}) в возрасте 1,5-2 мес с массой тела 19-22 г, полученных из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Содержались животные в виварии МРНЦ им. А.Ф. Цыба в соответствии с требованиями ГОСТ 33044-2014: в клетках Т-3, в условиях естественного освещения с принудительной 10-кратной вентиляцией, при температуре 18-20 °С и относительной влажности воздуха 40-70%, на подстилке из простерилизованных древесных стружек, со свободным доступом к питьевой воде и брикетированному корму ПК-120-1 (ООО Лабораторснаб, РФ). Все работы с животными были выполнены по стандартным операционным процедурам, принятым в МРНЦ им. А.Ф. Цыба, которые соответствуют правилам Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для научных целей.

Опухолевая модель. Использована эпидермоидная КЛЛ, штамм которой получен из банка опухолевых материалов ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина и поддерживался на самцах мышей С₅₇BL_{6j}. Трансплантировали КЛЛ самцам мышей F₁ (СВА'С₅₇BL_{6j}) путем подкожного введения 1,5×10⁶ клеток карциномы в 0,1 мл суспензии на основе среды 199 (ООО Пан-Эко, РФ) в область латеральной поверхности правого бедра.

Соединения. T1023 – водорастворимое, умеренно токсичное соединение (ЛД₁₀ и ЛД₅₀ – 260 и 410 мг/кг), синтезированное в лаборатории радиационной фармакологии МРНЦ; в работе использовали в виде 0,6% раствора, изготовленного на основе 0,9% раствора натрия хлорида (ОАО Дальхимфарм, РФ). БВЗ – антиангиогенное средство на основе моноклональных антител к VEGF; в работе использовали в виде 0,12% раствора, изготовленного на основе 0,9% раствора натрия хлорида из фармакопейного концентрата (авастин; Hoffmann–La Roche, Швейцария).

Экспериментальные группы, схемы воздействий. На 2-е сут после перевивки КЛЛ 88 мышей-опухоленосителей были распределены в 4 группы – контрольную и три опытные, по 22 особи в каждой. Животным первой опытной группы ежедневно, со 2 по 20 сут вводили соединение T1023 (60 мг/кг, в/б); второй опытной группы – трижды, на 2, 5 и 10 сут вводили БВЗ (12 мг/кг, в/б); третьей опытной группы – по этим схемам и в таких же дозах вводили и T1023, и БВЗ (при комбинированном применении T1023 вводили через 4 ч после введения БВЗ). Контрольным животным со 2 по 20 сут вводили 0,9% раствор натрия хлорида (0,2 мл, в/б).

Оценка противоопухолевых эффектов. С 7-х сут после перевивки КЛЛ у всех животных каждые 3-4 сут из-

меряли калипером максимальный (L) и минимальный (W) диаметры опухолей и рассчитывали их объемы в приближении $V=(L \times W^2) \times (\pi/6)$. Влияние на рост КЛЛ оценивали по межгрупповым различиям объемов узлов, длительности задержки роста и индексу торможения роста опухоли (ТРО) [12]. На 21-е сут животных выводили из опыта путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом (ОАО Медхимпром, РФ; 10 об. %), извлекали легкие, фиксировали их 24 ч в жидкости Буэна и под микроскопом CX21 (Olympus Corp., Япония) проводили подсчет числа лёгочных метастазов. Влияние на метастазирование оценивали по межгрупповым различиям числа метастазов и индексу ингибирования метастазирования (ИИМ) [12].

Гистологические методы исследования включали окрашивание срезов гематоксилином и эозином (рис. 1, А), иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание: на PCNA (рис. 1, Б), CD31 (рис. 1, В) и пимонидазол (рис. 1, Г), определение митотической активности и апоптотической гибели опухолевых клеток, а также компьютерный анализ микроскопических изображений.

Для изучения морфологии КЛЛ по 7 мышей из каждой группы выводили из опыта на 11-е сут после перевивки в экспоненциальной стадии роста опухолей. Опухолевые узлы выделяли под тиопенталовым наркозом (ОАО Синтез, РФ; 60 мг/кг, в/б). Ткань опухоли фиксировали 24 ч в кислой жидкости Буэна, обезжировали и заливали в «Гистомикс». ИГХ исследования на серийных срезах проводили методом биотин-стрептавидин-пероксидазного комплекса с использованием моноклональных мышиных антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток — PCNA (PC10, Dako, 1:400) и поликлональных кроличьих антител к маркеру эндотелия — PECAM-1 (CD31, M-20-R, Santa Cruz, 1:20) согласно ранее описанным нами методам [10].

Для выявления гипоксических клеток в опухолевой ткани использовали набор Нурухупробе-1 Omni Kit (Нурухупробе, Inc.; США), включающий гидрохлорид пимонидазола и кроличьи антитела PAb2627AP к белковым аддуктам пимонидазола. На 11 сутки роста КЛЛ всем особям из контрольной и опытных групп за 30 мин до эвтаназии пимонидазол вводили внутривентрально из расчета 60 мг/кг массы тела. Иммуноокрашивание пимонидазола выполнено с помощью биотинилированных козьих антител к кроличьим IgG (Sigma, 1:800) и экстравидин-пероксидазного комплекса (Sigma, 1:250). До нанесения антител к пимонидазолу депарафинированные срезы, погруженные в восстанавливающий раствор (Dako, S1699), прогревали в микроволновой печи (15 мин, 180 Вт). В растворе первых антител препараты инкубировали в течение 90 мин при

комнатной температуре. На всех этапах ИГХ в промыточный буфер добавляли 0,2% Brij 35.

Субстратную пероксидазу выявляли с использованием диаминобензидина (Liquid DAB+, Dako). При необходимости ядра клеток докрашивали гематоксилином.

Гистологические препараты изучали в микроскопе Leica DM 1000 с микрофото съемкой на цифровую камеру Leica ICC50 HD. Интегральные показатели, включающие объемное содержание паренхимы с реакцией ядер опухолевых клеток на PCNA, гипоксических клеток в паренхиме и зон некроза, а также количественные характеристики сосудов рассчитывали с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений с применением программы AnalySIS 5.0 (Soft Imaging System GmbH, Германия). Ангиоархитектуру КЛЛ при иммуноокрашивании на CD31 оценивали согласно принципам, описанным в работах [13, 14], в перитуморальной области и в «горячих точках» (“hot spots”), представляющих зоны солидного строения паренхимы опухоли, содержащие наибольшее количество капилляров и мелких венул. Перитуморальная область включала периферический край опухолей и окружающую их соединительную ткань. Количественную плотность опухолевых клеток по числу сечений их ядер на 1 мм² площади среза (клеточность), митотический индекс и индекс апоптоза в зонах роста опухолевых узлов определяли по стандартной методике при иммерсионном увеличении микроскопа при подсчете не менее 3000 ядер клеток [15].

Статистическая обработка. Значимость межгрупповых различий оценивали путем рангового дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса с применением критерия множественного сравнения Даннета и Данна.

Результаты и обсуждение

Анализ динамики роста КЛЛ показал, что при всех вариантах воздействия Т1023 и БВЗ отмечалось сходное влияние на развитие карциномы, проявлявшееся статистически значимым в течение всего срока наблюдения противоопухолевым эффектом (табл. 1). При раздельном воздействии Т1023 и БВЗ наблюдалась начальная задержка роста опухолевых узлов на 2-2,3 сут, и в дальнейшем торможение роста КЛЛ сохранялось на стабильном уровне: индекс ТРО находился в пределах 45-60% для БВЗ, и в пределах 50-65% для Т1023. Хотя между опытными группами статистически значимых различий в динамике роста КЛЛ не наблюдалось, у мышей с комбинированным применением Т1023 и БВЗ в исследованном периоде отмечалась устойчивая тенденция ($p = 0,07-0,11$) к усилению противоопухолевого эффекта.

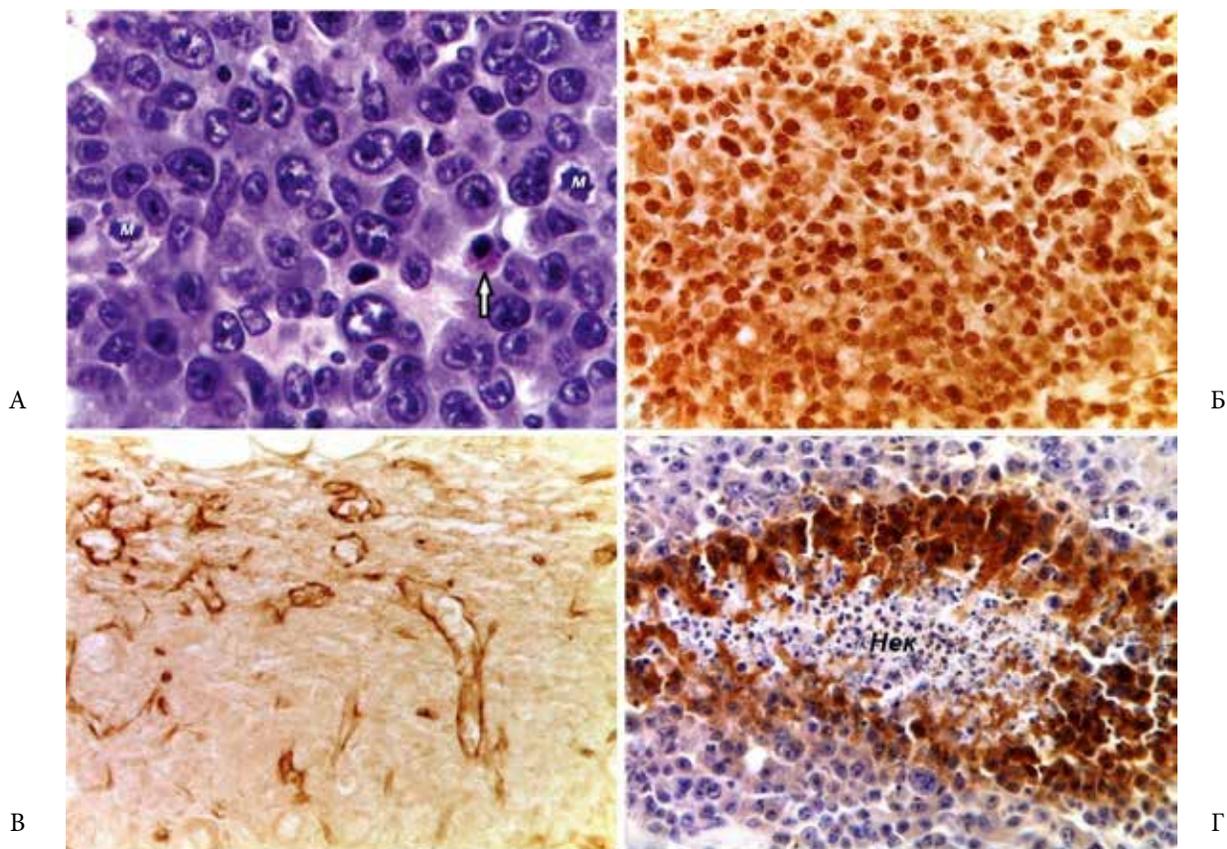


Рис. 1. Гистология карциномы легких Льюис в контроле на 11 сутки после трансплантации. А – окрашивание гематоксилином и эозином, м – митозы, стрелкой показан апоптоз опухолевой клетки; Б — иммуногистохимическая реакция ядер клеток с антителами к PCNA; В - иммуноокрашивание эндотелия сосудов с антителами к CD31 в зоне роста опухоли; Г – иммуногистохимическая реакция гипоксических опухолевых клеток с антителами к аддуктам пимонидазола, Нек – некроз опухоли. Увеличение: $\times 625$ (А); $\times 250$ (Б—Г).

Таблица 1

Влияние соединения T1023 и бевацизумаба на динамику роста КЛЛ

Время, сутки	Средний объем опухоли (V), см ³ (M±SD); Индекс ТРО, %						
	Контроль V	T1023		БВ3		T1023 + БВ3	
		V	ТРО	V	ТРО	V	ТРО
7	0,14±0,05	0,06±0,03 ¹	57	0,07±0,03 ¹	52	0,05±0,02 ¹	64
10	0,41±0,13	0,18±0,09 ¹	64	0,20±0,10 ¹	58	0,13±0,08 ¹	74
14	1,46±0,34	0,63±0,27 ¹	57	0,72±0,26 ¹	51	0,46±0,23 ¹	68
17	2,53±0,49	1,12±0,37 ¹	56	1,29±0,41 ¹	49	0,94±0,30 ¹	63
21	4,63±0,71	2,29±0,58 ¹	51	2,53±0,64 ¹	45	1,92±0,61 ¹	59

Примечание. Здесь и в табл. 2: ¹ – статистически значимое различие ($p < 0,05$) по критерию Даннета с контрольной группой (в группах $n = 15$).

Таблица 2

Влияние соединения T1023 и бевацизумаба на метастазирование КЛЛ

Показатель	Среднее число метастазов на 21 сутки (M±SD); ИИМ, %			
	Контроль	T1023	БВ3	T1023 + БВ3
Крупные метастазы	0,9±0,6	0,8±0,5	0,5±0,4	0,4±0,3
Малые метастазы	24,8±4,7	12,8±4,3 ¹	10,3±4,2 ¹	8,9±3,6 ¹
Все метастазы	25,8±5,0	13,6±4,5 ¹	10,8±4,4 ¹	9,3±3,7 ¹
ИИМ	-	47	60	64

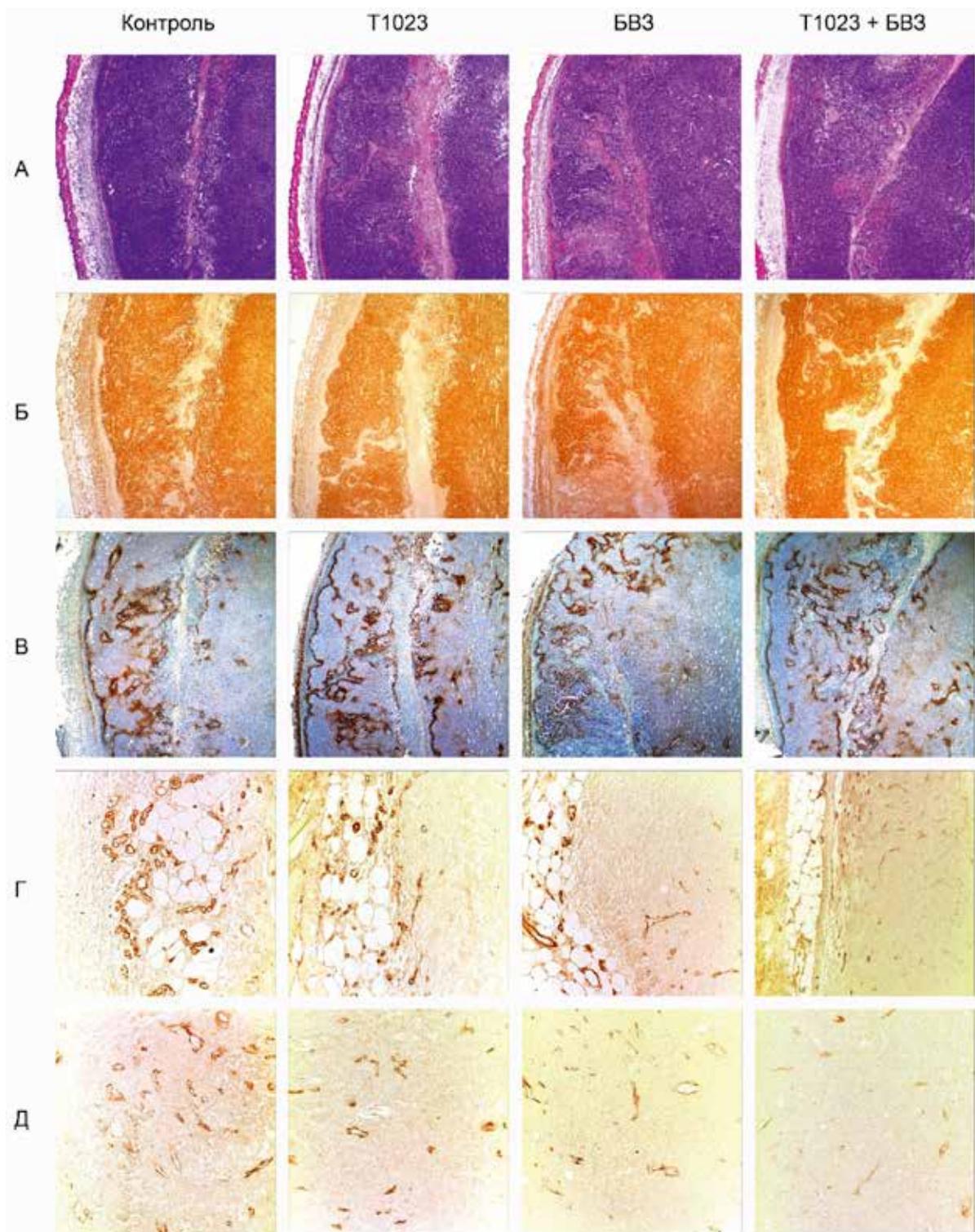


Рис. 2. Морфофункциональные характеристики карциномы лёгких Льюис на 11 сутки после перевивки в контроле, при раздельном и комбинированном воздействии соединения Т1023 и бевацизумаба. А—Г – серийные срезы; А – окрашивание гематоксилином и эозином (x8); Б — иммуноокрашивание на PCNA (x8); В — иммуноокрашивание на пимонидазол, ядра клеток докрашены гематоксилином (x8); Г, Д — иммуноокрашивание на CD31 в перитуморальной зоне (Г) и «горячих точках» паренхимы (Д) (x64).

В этом случае начальная задержка роста опухолевых узлов увеличилась до 3,2 сут, и в дальнейшем индекс ТРО находился на уровне 60—75%.

Аналогичная картина наблюдалась и по антиметастатическому действию — при всех вариантах воздействия число легочных метастазов на 21 сут роста КЛЛ снижалось статистически достоверно в 1,9-2,4 раза (табл. 2), и в группе, получавшей сочетанное воздействие, также присутствовала тенденция ($p = 0,08$) к усилению эффекта.

По данным гистологических исследований, у контрольных мышей опухолевые узлы на 11-е сут роста имели солидный тип строения (рис. 1, А). В центральных и периферических отделах опухолей располагались узкие оксифильные поля спонтанного некроза, представленные клеточным детритом (рис. 2, А). В участках солидного строения паренхимы была представлена полями плотно упакованных опухолевых клеток. В полях зрения наблюдались относительно многочисленные фигуры митоза и единичные клетки, погибающие путем апоптоза. В периферических зонах роста опухолевые клетки вытянутой или неправильной формы были диссоциированы друг от друга. Зоны инвазии КЛЛ в здоровую ткань формировались отдельными клетками или их скоплениями в виде тяжей, между которыми располагались врастающие в паренхиму кровеносные сосуды.

Жизнеспособная паренхима КЛЛ с пролиферирующими опухолевыми клетками отчетливо контурировалась при ИГХ окрашивании на PCNA (рис. 1, Б; 2, Б). Клетки карциномы с интенсивной окраской ядер на этот циклин располагались, преимущественно, в локусах инвазивного роста и по периферии узлов, концентрируясь вокруг сосудов. Сосуды, врастающие в паренхиму КЛЛ, выстланы уплощенным эндотелием с реакцией их ядер на PCNA.

ИГХ окрашивание на пимонидазол носило зональный характер. Судя по интенсивности положительной реакции, опухолевые клетки в состоянии глубокой гипоксии ($pO_2 < 10$ мм Hg) располагались преимущественно на границе с некрозом в виде узких перинекротических ободков шириной 20-50 мкм (рис. 1, Г; 2, В). Реакция на маркер гипоксии не определялась в области некроза и практически отсутствовала в участках высокой пролиферативной активности опухолевых клеток.

При иммуноокрашивании срезов на CD31 определялась характерная неоднородность распределения в КЛЛ кровеносных сосудов. Так, относительно васкуляризованы зоны паренхимы, прилегающие к подкожной клетчатке. В перитуморальной зоне микроциркуляторное русло было представлено многочисленными тонкостенными сосудами (рис. 1, В; 2, Г). От венул, расположенных в здоровых тканях, ответвлялись короткие капиллярные петли, врастающие в паренхиму опухоли. Сосуды, расположенные в толще солидной зоны паренхимы (рис. 2, Д), местами расширены, выстланы уплощенным или умеренно набухшим эндотелием.

Соединение Т1023 и БВ3 при их раздельном применении оказывали однонаправленное действие на КЛЛ, и к 11 суткам роста вызывало сходные изменения в паренхиме неоплазии. Наблюдалось статистически значимое снижение (в 1,4—1,6 раза) объема опухолей (табл. 3). На обзорных препаратах гистологический рисунок опухолевых узлов выглядел без существенных изменений. Однако обращало на себя внимание увеличение содержания в периферических участках опухолей, особенно со стороны подкожной клетчатки, разветвлённых прослоек некроза (рис. 2, А), окружённых ободками гипоксических клеток (рис. 2, В). Нередко в этих зонах визуально снижалась интен-

Таблица 3

Морфометрические показатели тканей КЛЛ на 11-е сут роста в контроле и при воздействии соединения Т1023 и бевацизумаба (M±SD)

Показатель	Контроль	Т1023	БВ3	Т1023 + БВ3
Объем опухолей, см ³	0,25±0,05	0,16±0,05 ¹	0,18±0,04 ¹	0,15±0,07 ¹
Объемное содержание зон некроза, %	18,0±3,9	19,2±8,6	14,1±6,0	19,8±7,2
Объемное содержание паренхимы (окраска на PCNA), %	68,1±7,4	65,9±6,9	67,2±4,9	64,0±9,2
Фракция гипоксических клеток в паренхиме, %	11,7±3,3	14,7±6,1	17,3±4,0 ¹	23,7±6,6 ^{1,2,3}
Количественная плотность опухолевых клеток, 10 ³ /мм ²	5,89±0,12	5,68±0,20	6,05±0,25	5,42±0,33 ^{1,3}
Митотический индекс, %	1,66±0,25	1,70±0,08	1,46±0,07	1,59±0,26
Индекс апоптоза, %	0,44±0,08	0,76±0,10 ¹	0,78±0,20 ¹	0,93±0,08 ^{1,2,3}

Примечание. Здесь и в табл. 4: статистически достоверное различие ($p < 0,05$) по критерию Данна: ¹ — с контрольной группой; ² — с группой, получавшей Т1023; ³ — с группой, получавшей БВ3 (в группах $n = 7$).

сивность иммуноокрашивания паренхимы на PCNA (рис. 2, Б).

При микроскопическом исследовании наблюдалось усиление полиморфизма ангиоархитектоники КЛЛ, отёк и дистрофические изменения в паренхиме, которые сопровождались цитолитической деструкцией и усилением апоптотической гибели опухолевых клеток. Отмечалось сращивание эндотелия в крупных сосудах с плазматическим пропитыванием их стенок. Иногда выявлялись плазморрагия и микрокровоизлияния. На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, ядра эндотелия сосудов выглядели уплощёнными и гиперхромными, некоторые из них были пикнотичными. Появлялись морфологические признаки усиления гипоксии паренхимы опухолей с характерным уменьшением в этих зонах размеров опухолевых клеток и снижением интенсивности иммуноокрашивания их ядер на PCNA. Реже, чем в контроле, выявлялись и PCNA-положительные ядра эндотелиальных клеток. При окрашивании на CD31 визуально выявлялось снижение содержания сосудов в перитуморальной зоне (рис. 2, Г) и в зонах солидного строения паренхимы, где большая часть капилляров имела щелевидную форму (рис. 2, Д).

По данным морфометрии (табл. 3, 4), наиболее выраженное снижение содержания сосудов под влиянием T1023 и БВ3 наблюдалось в «горячих точках» опухолевой ткани (в 1,3-1,5 раза), что коррелировало с увеличением фракции гипоксических клеток в паренхиме (в 1,3-1,5 раза) и ростом гибели опухолевых клеток путем апоптоза (в 1,8 раза).

Сходство морфофункциональных изменений в КЛЛ, развивающихся при воздействии ингибитора NOS и VEGF-ингибитора, позволяет предполагать, что основой противоопухолевых эффектов соединения T1023 является антиангиогенное действие. Это согласуется с результатами ряда работ, в которых показано, что некоторые известные ингибиторы NOS (L-NMMA, L-NAME, аминоксантидин, кавтрин, 1400W) так-

же вызывают нарушения васкуляризации и торможение роста экспериментальных неоплазий [16-19].

Различие молекулярных мишеней, через которые T1023 и БВ3 реализуют свое действие, потенциально создает возможности для усиления ангиостатического влияния при их сочетанном применении. И, если по влиянию на рост и метастазирование КЛЛ такое взаимодействие T1023 и БВ3 оставалось в пределах статистической тенденции (табл. 1, 2), то при гистологических исследованиях оно проявилось более отчетливо. В опухолях животных, получавших комбинированное воздействие, к 11 сут роста развивались аналогичные морфологические изменения, как и при раздельном воздействии этих соединений, но с более выраженным снижением содержания кровеносных сосудов в опухолевых узлах, усилением гипоксии паренхимы и апоптотической девитализации клеток карциномы.

В некоторых опухолевых узлах отмечалось расширение зон центрального некроза, которые в отдельных местах захватывали значительную часть неопластической ткани. Периферические очаги некроза с локальными кровоизлияниями также выглядели более обширными и разветвленными (рис. 2, А). Визуально снижалась интенсивность иммуноокрашивания на PCNA (рис. 2, Б). Наряду с перинекротическими ободками гипоксических клеток в зонах солидного строения паренхимы появлялись многочисленные диффузные очаги с неравномерной интенсивностью окрашивания опухолевых клеток на маркер гипоксии (рис. 2, В). При окрашивании на CD31 отчетливо выявлялось снижение количества сосудов в перитуморальной зоне (рис. 2, Г) и капилляров в «горячих точках» паренхимы (рис. 2, Д). По данным морфометрии (табл. 3, 4), при комбинированном воздействии объемное содержание сосудов в перитуморальной зоне снизилось относительно контроля в 1,4 раза, а в «горячих точках» паренхимы – в 1,6 раза, что сопровождалось увеличением фракции гипоксических клеток и усилением апоптотической гибели опухолевых клеток в 2 раза. Эти количествен-

Таблица 4

Морфометрические показатели сосудистой сети КЛЛ на 11-е сут роста в контроле и при воздействии соединения T1023 и бевацизумаба (M±SD)

Показатель	Локализация	Контроль	T1023	БВ3	T1023 + БВ3
Объемное содержание сосудов, %	Перитумор. обл.	4,6±1,6	4,1±0,5	3,7±0,5	3,2±0,5 ¹
	Горячие точки	2,8±0,6	2,1±0,3 ¹	1,9±0,3 ¹	1,7±0,3 ¹
Количественная плотность сосудов, /мм ²	Перитумор. обл.	105±14	111±17	96±21	93±13
	Горячие точки	170±54	125±9 ¹	139±49	114±25 ¹
Средняя площадь сечения сосудов, мкм ²	Перитумор. обл.	488±130	352±93	439±151	430±69
	Горячие точки	195±57	148±21	155±21	157±42

ные характеристики были близки к уровню аддитивного действия T1023 и БВЗ.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют, что ингибитор NOS T1023 и бевацизумаб оказывают однонаправленное противоопухолевое действие на КЛЛ, сопровождающееся торможением роста и подавлением метастазирования неоплазии. Согласно результатам количественного анализа, при комбинированном применении их антинеопластическая эффективность была близка к уровню аддитивного действия T1023 и БВЗ. Эти результаты позволяют предполагать, что основой противоопухолевой активности соединения T1023 является антиангиогенное действие и свидетельствуют о перспективности применения ингибиторов NOS в комбинированной ангиостатической терапии солидных злокачественных опухолей в сочетании с имеющимися *антинеоваскулярными* средствами.

Литература

1. Welts J., Loges S., Dimmeler S., Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest.* 2013; 123(8): 190-200.
2. Rao N., Lee Y.F., Ge R. Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin.* 2015; 36(10): 1177-90.
3. Bergers G., Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(8): 592-603.
4. Arbab A.S. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma. *Histol Histopathol.* 2012; 27(5): 549-57.
5. Grothey A., Van Cutsem E., Sobrero A., Siena S., Falcone A., Ychou M. et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicenter, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2013; 381(9863): 303-12.
6. Frandsen S., Kopp S., Wehland M., Pietsch J., Infanger M., Grimm D. Latest results for anti-angiogenic drugs in cancer treatment. *Curr Pharm Des.* 2016; 22(39): 5927-42.
7. Ziche M., Morbidelli L. Molecular regulation of tumor angiogenesis by nitric oxide. *Eur Cytokine Netw.* 2009; 20(4): 164-70.
8. Bian K., Murad F. What is next in nitric oxide? From cardiovascular system to cancer biology. *Nitric Oxide.* 2014. 43: 3-7.
9. Rabender C.S., Alam A., Sundaresan G., Cardnell R.J., Yakovlev V.A., Mukhopadhyay N.D. et al. The role of nitric oxide synthase uncoupling in tumor progression. *Mol Cancer Res.* 2015; 13(6): 1034-43.
10. Филимонова М.В., Южаков В.В., Шевченко Л.И., Бандурко Л.Н., Севаньякаева Л.Е., Макачук В.М. и др. Экспериментальное исследование противоопухолевой активности нового ингибитора синтаз оксида азота T1023. *Молекулярная медицина.* 2015; (1): 61-4.
11. Каприн А.Д., Галкин В.Н., Жаворонков Л.П., Иванов В.К., Иванов С.А., Романко Ю.С. Синтез фундаментальных и при-

кладных исследований - основа обеспечения высокого уровня научных результатов и внедрения их в медицинскую практику. *Радиация и риск.* 2017; 26(2): 26-40.

12. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.* М.; Гриф и К, 2012.
13. Al-Najar A., Al-Sanabani S., Korda J.B., Hegele A., Bolenz C., Herbst H. et al. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2012; 30(3): 325-9.
14. Di Ieva A. Angioarchitectural morphometrics of brain tumors: are there any potential histopathological biomarkers? *Microvasc Res.* 2010; 80(3): 522-33.
15. Южаков В.В., Севаньякаева Л.Е., Ульяненко С.Е., Яковлева Н.Д., Кузнецова М.Н., Цыганова М.Г. и др. Эффективность фракционированного воздействия γ -излучения и быстрых нейтронов на саркому М-1. *Радиационная биология. Радиационная биология.* 2013; 53(3): 267-79.
16. Kashiwagi S., Izumi Y., Gohongi T., Demou Z.N., Xu L., Huang P.L. et al. NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineering blood vessels. *J Clin Invest.* 2005; 115(7): 1816-27.
17. Mohamad N.A., Cricco G.P., Sambuco L.A., Croci M., Medina V.A., Gutierrez A.S. et al. Aminoguanidine impedes human pancreatic tumor growth and metastasis development in nude mice. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(9): 1065-71.
18. Lampson B.L., Kendall S.D., Ancrile B.B., Morrison M.M., Shealy M.J., Barrientos K.S. et al. Targeting eNOS in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2012; 72(17): 4472-82.
19. Janakiram N.B., Rao C.V. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress. *Future Med Chem.* 2012; 4(17): 2193-204.

References

1. Welts J., Loges S., Dimmeler S., Carmeliet P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest.* 2013; 123(8): 190-200.
2. Rao N., Lee Y.F., Ge R. Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin.* 2015; 36(10): 1177-90.
3. Bergers G., Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(8): 592-603.
4. Arbab A.S. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma. *Histol Histopathol.* 2012; 27(5): 549-57.
5. Grothey A., Van Cutsem E., Sobrero A., Siena S., Falcone A., Ychou M. et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicenter, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2013; 381(9863): 303-12.
6. Frandsen S., Kopp S., Wehland M., Pietsch J., Infanger M., Grimm D. Latest results for anti-angiogenic drugs in cancer treatment. *Curr Pharm Des.* 2016; 22(39): 5927-42.
7. Ziche M., Morbidelli L. Molecular regulation of tumor angiogenesis by nitric oxide. *Eur Cytokine Netw.* 2009; 20(4): 164-70.
8. Bian K., Murad F. What is next in nitric oxide? From cardiovascular system to cancer biology. *Nitric Oxide.* 2014. 43: 3-7.
9. Rabender C.S., Alam A., Sundaresan G., Cardnell R.J., Yakovlev V.A., Mukhopadhyay N.D. et al. The role of nitric oxide synthase uncoupling in tumor progression. *Mol Cancer Res.* 2015; 13(6): 1034-43.

10. Filimonova M.V., Yuzhakov V.V., Shevchenko L.I., Bandurko L.N., Sevankaeva L.E., Makarchuk V.M. et al. Experimental study of antitumor activity of new nitric oxide synthase inhibitor T1023. *Molekulyarnaya meditsina*. 2015; (1): 61-4. (in Russian)
11. Kaprin A.D., Galkin V.N., Zhavoronkov L.P., Ivanov V.K. etc. Synthesis of fundamental and applied research is the basis for ensuring a high level of scientific results and their introduction into medical practice. *Radiatsiya i Risk*. 2017; 26(2): 26-40. (in Russian)
12. *A guide to preclinical drug research. Part one [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya]*. Moscow; Grif I K, 2012. (in Russian)
13. Al-Najar A., Al-Sanabani S., Korda J.B., Hegele A., Bolenz C., Herbst H. et al. Microvessel density as a prognostic factor in penile squamous cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2012; 30(3): 325-9.
14. Di Ieva A. Angioarchitectural morphometrics of brain tumors: are there any potential histopathological biomarkers? *Microvasc Res*. 2010; 80(3): 522-33.
15. Yuzhakov V.V., Sevankaeva V.V., Ulyanenko S.E., Yakovleva S.A., Kuznetsova M.N., Tsyganova M.N. et al. Effectiveness of fractionated action of g-radiation and fast neutrons on M-1 sarcoma. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2013; 53(3): 267-79. (in Russian)
16. Kashiwagi S., Izumi Y., Gohongi T., Demou Z.N., Xu L., Huang P.L. et al. NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineering blood vessels. *J Clin Invest*. 2005; 115(7): 1816-27.
17. Mohamad N.A., Cricco G.P., Sambuco L.A., Croci M., Medina V.A., Gutierrez A.S. et al. Aminoguanidine impedes human pancreatic tumor growth and metastasis development in nude mice. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(9): 1065-71.
18. Lampson B.L., Kendall S.D., Ancrile B.B., Morrison M.M., Shealy M.J., Barrientos K.S. et al. Targeting eNOS in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2012; 72(17): 4472-82.
19. Janakiram N.B., Rao C.V. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress. *Future Med Chem*. 2012; 4(17): 2193-204.

Сведения об авторах:

Филимонова Марина Владимировна, доктор биол. наук, зав. лаб. радиационной фармакологии, e-mail: mari_fil@mail.ru

Южаков Вадим Васильевич, канд. мед. наук, руководитель лаб. радиационной патоморфологии;

Филимонов Александр Сергеевич, науч. сотр. лаб. радиопатологии

Макарчук Виктория Михайловна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. радиационной фармакологии;

Бандурко Любовь Николаевна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии;

Корнеева Татьяна Сергеевна, мл. науч. сотр. лаб. радиационной фармакологии;

Самсонова Алина Сергеевна, мл. науч. сотр. лаб. радиационной фармакологии;

Цыганова Марина Геннадьевна, науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии;

Шевченко Людмила Ивановна, канд. химич. наук, вед. науч. сотр. лаб. радиационной фармакологии;

Севанькаева Лариса Евгеньевна, ст. науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии;

Фомина Наталья Константиновна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии;

Ингель Ирина Эдуардовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии;

Яковлева Нина Дмитриевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. радиационной патоморфологии.