

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-4-76-88>

Влияние ЛХС-1269 на морфологию и ангиогенез карциномы легкого Льюис

И.Б. Меркулова, И.С. Голубева, Д.А. Хоченков, Т.В. Абрамова, Н.П. Ермакова, Л.В. Эктова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ирина Сергеевна Голубева irinagolubewa52@mail.ru

Введение. Новое противоопухолевое соединение ЛХС-1269 из класса индолокарбазолов проходит доклинические исследования в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. ЛХС-1269 обладает высокой противоопухолевой активностью на перевиваемых опухолях мышей, проявляет значимую цитотоксическую активность на многих клеточных линиях *in vitro*, ингибирует васкулогенную мимикрию в опухолях *in vitro*. ЛХС-1269 не влияет на каталитическую активность топоизомераз I и IIα человека. Возможен антиангиогенный механизм противоопухолевого действия ЛХС-1269.

Цель исследования – оценка влияния ЛХС-1269 на морфологические особенности и ангиогенез перевиваемой эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC) мышей.

Материалы и методы. Группа мышей ($n = 20$) линии BDF₁ с перевитой опухолью LLC на 1-е и 3-и сутки после 5-кратного внутрибрюшинного введения ЛХС-1269 в разовой дозе 60 мг (суммарная доза – 300 мг/кг); группа мышей ($n = 20$) на 5-е и 8-е сутки после однократного внутривенного введения препарата в дозе 100 мг/кг и группа мышей ($n = 20$) с перевитыми опухолями, которым препарат не вводили (контроль). Оценивали противоопухолевый эффект по критерию торможения роста опухоли (%) и исследовали морфологические особенности опухолей. Для оценки влияния ЛХС-1269 на опухолевый ангиогенез в срезах опухоли LLC проводили визуальный подсчет среднего числа (плотности) кровеносных сосудов и иммуногистохимическое выявление экспрессии маркера эндотелия CD31⁺.

Результаты. Соединение ЛХС-1269 в группах животных при 5-кратном и однократном применении вызывало торможение роста опухоли (59–70 и 67–79 %) с выраженными морфологическими изменениями и гибелью опухолевых клеток. В опухолях и окружающих тканях во всех группах обнаружено неравномерное распределение кровеносных сосудов. ЛХС-1269 вызывало статистически значимое уменьшение среднего числа кровеносных сосудов в опухоли как после 5-кратного, так и после однократного введения. Статистически значимое уменьшение среднего числа кровеносных сосудов в окружающей опухоль соединительной ткани наблюдали лишь после 5-кратного введения препарата. Снижение среднего числа CD31⁺-эндотелиальных клеток после 5-кратного внутрибрюшинного введения было статистически незначимым по сравнению с контролем ($83,1 \pm 8,7$ и $59,6 \pm 18,9$ соответственно). Увеличение этого показателя после однократного внутривенного введения ЛХС-1269 по сравнению с контролем было статистически значимым.

Заключение. ЛХС-1269 при 5-кратном и однократном введении мышам вызывал выраженные морфологические изменения в виде повреждений и гибели клеток опухоли LLC. Результаты исследования ангиогенеза в опухоли не позволяют сделать однозначный вывод об угнетающем действии ЛХС-1269 на сосудистую сеть опухоли LLC у мышей.

Ключевые слова: противоопухолевое соединение ЛХС-1269, эпидермоидная карцинома легкого Льюис, ангиогенез, морфологические изменения, мембранный белок CD31, эндотелиальные клетки

Для цитирования: Меркулова И.Б., Голубева И.С., Хоченков Д.А. и др. Влияние ЛХС-1269 на морфологию и ангиогенез карциномы легкого Льюис. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):76–88. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-76-88

Effect of LHS-1269 on morphology and angiogenesis of Lewis lung carcinoma

Irina B. Merkulova, Irina S. Golubeva, Dmitriy A. Khochenkov, Tatiana V. Abramova, Nadezhda P. Ermakova, Lidia V. Ektova

N. N. Blokhin National Medical Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24, Kashirskoe Shosse, Moscow 115552, Russia

Contacts: Irina Sergeevna Golubeva irinagolubewa52@mail.ru

Background. The new anticancer chemical compound LHS-1269 from the class of indolocarbazoles is undergoing preclinical studies at the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia. LHS-1269 has a high antitumor activity on transplanted tumors of mice, showed high cytotoxic activity on many tumor cells lines *in vitro*, and has shown an inhibitory effect on vasculogenic mimicry in tumors *in vitro*. LHS-1269 does not affect the catalytic activity of human topoisomerases I and II α . An antiangiogenic mechanism of the drug's antitumor action is suggested.

Aim. To evaluate the effect of LHS-1269 on the morphological features and angiogenesis of transplanted Lewis lung carcinoma (LLC) in BDF₁ mice.

Materials and methods. In BDF₁ mice ($n = 20$) with transplanted LLC tumor on days 1 and 3 after 5-fold intraperitoneal administration of LHS-1269 in a single dose of 60 mg (total dose – 300 mg/kg), mice ($n = 20$) on days 5 and 8 after a single intravenous injection of LHS-1269 at a dose of 100 mg/kg, mice ($n = 20$) with transplanted LLC tumor without administration of LHS-1269 (control). The assessment of the antitumor effect was carried out according to the criterion of inhibition of tumor growth (%) and the study of the morphological features of the tumors. To assess the effect of LHS-1269 on tumor angiogenesis in LLC tumor sections, a visual calculation of the average number (density) of blood vessels and immunohistochemical detection of expression of the CD31⁺ endothelial marker were performed.

Results. The LHS-1269 compound in animal groups with 5-fold and 1-fold use caused tumor growth inhibition – 59–70 and 67–79 %, with pronounced morphological changes and tumor cell death. There is an uneven distribution of blood vessels in tumors and surrounding tissues in all groups. LHS-1269 caused a statistically significant decrease in the average number of blood vessels in the tumor both after 5-fold and after 1-fold administration. The statistically significant decrease in the average number of blood vessels in the surrounding connective tissue tumor was observed only after 5-fold administration of the drug. The decrease in the average number of CD31⁺ endothelial cells after five times intraperitoneal administration was statistically insignificant compared to control (83.1 ± 8.7 and 59.6 ± 18.9 , respectively). The increase in this indicator after a single intravenous injection of LHS-1269 was statistically significant.

Conclusion. LHS-1269, when administered five times and once in mice, caused pronounced morphological changes in the form of damage and death of LLC tumor cells. The results of a study of angiogenesis in a tumor do not allow an unambiguous conclusion about the inhibitory effect of LHS-1269 on angiogenesis in LLC tumors in mice.

Keywords: antitumor compound LHS-1269, Lewis lung carcinoma, angiogenesis, morphological changes, membrane protein CD31, endothelial cells

For citation: Merkulova I.B., Golubeva I.S., Khochenkov D.A. et al. Effect of LHS-1269 on morphology and angiogenesis of Lewis lung carcinoma. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(4):76–88. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-76-88

Введение

Новое соединение с противоопухолевой активностью ЛХС-1269 из класса индолокарбазолов отобрано из большого числа гликозидов индолокарбазолов и проходит доклиническое исследование с изучением механизмов противоопухолевого действия в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [1]. Установлено, что ЛХС-1269 обладает высокой противоопухолевой активностью на перевиваемых солидных и асцитных опухолях мышей [1–3]. Препарат проявил цитотоксическую активность на опухолевых клеточных линиях *in vitro* при исследовании с помощью МТТ-теста [4, 5], однако не влиял на каталитическую активность топоизомераз I и II α человека [5]. Показан ингибирующий эффект ЛХС-1269 на васкулогенную мимикрию в опухолях *in vitro* [4]. Имеются данные об антиангиогенном и антипролиферативном действии некоторых производных индолокарбазола. Так, аналоги алкалоида стауроспорина, производного индолокарбазола, являющегося неизбирательным ингибитором проте-

инкиназы C, подавляли формирование капиллярной трубки из эндотелиоцитов линии HUVEC в матрицельной матрице *in vitro* и вызывали некоторое уменьшение числа метастазов карциномы легкого Льюис (Lewis lung carcinoma, LLC) мышей *in vivo* [6]. В связи с вышеизложенным для соединения ЛХС-1269 мы предполагаем возможность антиангиогенного механизма противоопухолевого действия. Как известно, сосудистая сеть опухолей, обеспечивая опухолевые клетки питательными веществами и кислородом, способствует выведению продуктов обмена веществ. Регуляция ангиогенеза осуществляется с помощью ростовых факторов, специфичных для эндотелия кровеносных сосудов и продуцируемых опухолевыми и некоторыми стромальными клетками [7–9]. Некоторые злокачественные опухоли способны формировать сосудистоподобные каналы без эндотелиальных клеток (васкулогенная мимикрия) и экспрессировать маркеры, характерные для эндотелиальных клеток [4, 10]. Известно, что ингибирующий эффект антиангиогенных таргетных противоопухолевых препаратов связан с блокированием активации

рецепторов ростовых факторов на клетках эндотелия кровеносных сосудов опухоли, что приводит к снижению неоангиогенеза, развитию гипоксии, последующему повреждению и гибели опухолевых клеток и, как следствие, торможению роста опухоли (ТРО) [11, 12].

Среди существующих методов оценки ангиогенеза в злокачественных опухолях иммуногистохимическая оценка плотности микрососудов является основным способом анализа [13]. При этом используют маркеры клеток эндотелия кровеносных сосудов при иммуногистохимическом анализе ткани, такие как гликопротеин, мембранный белок CD31, антиген фактора VIII, CD34 и др. [14–16]. Химиопрепараты разных классов могут оказывать антиангиогенное действие на опухоли. Так, препарат араноза наряду с высоким противоопухолевым эффектом на перевиваемой опухоли LLC дозозависимо снижал неоангиогенез в участках максимальной плотности микрососудов [17]. Показано также, что применение наноразмерной формы доксорубина у крыс Wistar с перевиваемой глиобластомой 101.8 вызывало снижение объемной доли и количества сосудов в опухоли (антиангиогенное действие), выявляемых с помощью маркера эндотелия изолектина B4, что наблюдалось параллельно с гибелью опухолевых клеток и снижением их пролиферативной активности [18]. Однако неясно, на какие молекулярные мишени ангиогенеза эти препараты влияют.

Как отмечено выше, соединение ЛХС-1269 обладает цитотоксическим действием на опухолевые клетки *in vitro* [4, 5], но морфологические исследования изменений в опухолях под влиянием этого препарата *in vivo* не проводились. Учитывая, что повреждение и гибель опухолевых клеток могут в какой-то степени снижать продукцию ангиогенных факторов, мы в настоящем исследовании попытались оценить взаимосвязь между морфологическими изменениями опухоли LLC и ее васкуляризацией под воздействием ЛХС-1269, примененного в дозах и режимах, оказывающих высокий противоопухолевый эффект у мышей [3]. Результаты многочисленных морфологических исследований перевиваемых опухолей мышей и крыс, полученные при углубленном доклиническом изучении противоопухолевых соединений разных классов, обладающих цитостатической и цитотоксической активностью, опубликованные в 60–80-е годы прошлого века, и в настоящее время остаются актуальными при изучении действия новых противоопухолевых препаратов, их комбинаций между собой и с модифицирующими факторами [19, 20], а также в клинической практике при оценке лекарственного патоморфоза злокачественных опухолей с целью прогноза онкологического заболевания [21, 22]. В этих работах при использовании рутинных ги-

стологических методик (окраска гематоксилином и эозином) на перевиваемых опухолях или клиническом опухолевом материале изучаются динамика патоморфологических изменений в опухоли, особенности изменений и гибели опухолевых клеток, изменения стромы и ее клеток, особенности клеточной инфильтрации; оценивается количество пролиферирующих клеток (фигуры митозов), очагов некроза, наличие и состояние кровеносных сосудов. Исследование морфологических особенностей перевиваемой опухоли LLC мышей, визуальный подсчет кровеносных сосудов, а также иммуногистохимическое выявление и подсчет кровеносных микрососудов с использованием маркера эндотелия CD31 при воздействии ЛХС-1269 могут внести определенный вклад в понимание механизма действия этого соединения.

Цель исследования — оценка влияния ЛХС-1269 на морфологические особенности и ангиогенез перевиваемой LLC у мышей BDF₁.

Материалы и методы

Исследование выполнено на иммунокомпетентных мышах, которых содержали в виварии при естественном освещении, на стандартном рационе питания и со свободным доступом к воде. Использовано 60 мышей-самок линии BDF₁ (C57Bl/6 × DBA/2) массой 18–22 г, полученных из отдела разведения лабораторных животных ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Соединение с противоопухолевой активностью ЛХС-1269 использовали в экспериментальной лекарственной форме ЛФ 1 (состав: субстанция ЛХС-1269, коллидон 17PF, этанол, диметилсульфоксид, вода).

Для исследования использовали эпидермоидную LLC. Эта модель опухолевого роста мышей широко применяется в экспериментальной онкологии [23].

Для трансплантации опухолевую ткань рака легкого мыши LLC измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10 и 0,5 мл (50 мг опухолевой массы) полученной суспензии вводили подкожно в область правой подмышечной впадины мышам.

Через 48 ч после перевивки мыши с опухолями были разделены на 3 группы по 20 мышей в каждой: 1-я группа (контроль) — мыши с перевитыми опухолями, которым препарат не вводили; 2-я группа — мыши, которым через 48 ч после перевивки опухоли вводили 5-кратно внутрибрюшинно с интервалом 24 ч ЛХС-1269 в разовой дозе 60 мг/кг (суммарная доза — 300 мг/кг); 3-я группа — мыши, которым через 48 ч после перевивки опухоли вводили ЛХС-1269 внутривенно однократно в дозе 100 мг/кг.

Для гистологического и иммуногистохимического исследования опухолей по 10 мышей из каждой

группы выводили из опыта на 7-е и 10-е сутки после перевивки опухоли соответственно, на 1-е и 3-и сутки после окончания 5-кратного внутрибрюшинного и на 5-е и 8-е сутки после однократного внутривенного введения соединения ЛХС-1269. Мышей усыпляли диэтиловым эфиром. Затем по общепринятой методике, используя измерение 3 диаметров каждой опухоли, определяли средний объем опухоли и ТРО (%) в каждой группе [23]. На вскрытии опухоли удаляли и помещали в 10 % нейтральный формалин для фиксации. По окончании фиксации опухоли подвергали общепринятой гистологической обработке, включавшей заливку в парафин; половину срезов толщиной 5 мкм от каждой опухоли окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали под световым микроскопом фирмы Leica при увеличении: $\times 100$, $\times 400$ и $\times 1000$. Другую половину срезов опухолей использовали для иммуногистохимического исследования.

Гистологическое исследование включало изучение общей морфологии опухолей, опухолевых клеток, особенностей расположения кровеносных сосудов в опухоли и в окружающих тканях (рыхлой соединительной и жировой ткани), подсчет визуализируемых кровеносных сосудов на 1 поле зрения при увеличении $\times 1000$ в 10–20 участках жизнеспособной ткани каждой опухоли (в зависимости от площади среза) и в прилежащей к ней соединительной или жировой ткани. При этом учитывали все видимые кровеносные сосуды (поперечные или продольные срезы) диаметром от 3–10 до 70–100 мкм, преимущественно содержащие эритроциты. Результаты подсчета средних величин числа сосудов на 1 поле зрения микроскопа в каждой опухоли усредняли и получали среднее арифметическое число кровеносных сосудов на 1 поле зрения опухоли в каждой группе.

Иммуногистохимическое определение количества микрососудов в опухоли проводили стандартным методом с использованием антител к CD31 (Abcam) — маркеру клеточной адгезии клеток эндотелия в участках высокой плотности микрососудов. Инкубация с антителами проходила в течение 18 ч при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Проявку результатов (экспрессию CD31) проводили при помощи EnVision +kit (Dako). Гистологические срезы докрашивали гематоксилином и заключали под покровное стекло. Подсчет окрашенных CD31⁺-микрососудов выполняли в 20 полях зрения микроскопа при увеличении $\times 200$.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Office и BioStat Professional. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

У мышей контрольной группы на 7-е сутки после перевивки опухоль состояла преимущественно из

2–3 узелков, окруженных рыхлой соединительной или жировой тканью (рис. 1). По морфологическому строению опухоль соответствовала штамму LLC [24]. Опухоль состояла в основном из плотно расположенных полиморфных округлых клеток, большая часть которых имела круглые светлые ядра с глыбками хроматина и крупными 1–2 ядрышками. На периферии опухолевые клетки располагались более рыхло, разрозненно, границы цитоплазмы четкие; в некоторых участках опухолевые клетки образовывали синцитий. Среди жизнеспособных опухолевых клеток обнаруживали единичные клетки с признаками апоптоза или некроза. В некоторых участках опухолей находили митотические фигуры (по 2–3 в поле зрения при увеличении $\times 1000$). В большинстве опухолей этой группы обнаруживали очаги некроза, что характерно для LLC [24]. Вокруг опухоли, в рыхлой соединительной и жировой тканях, наблюдали неравномерную лимфомакрофагальную инфильтрацию, более сильную вблизи очагов некроза. Кроме того, в соединительной и жировой тканях с одной стороны и в мышечной ткани с другой стороны опухоли обнаруживали инвазию тканей опухолевыми клетками, что также характерно для LLC [24].

Кровеносные сосуды внутри опухоли обнаруживали в небольшом количестве, в основном в виде тонкостенных капилляров и венул, преимущественно содержащих эритроциты. На периферии опухоли кровеносные сосуды находили в большем количестве. Следует заметить, что кровеносные сосуды располагались неравномерно как в опухоли, так и в прилежащих к ней тканях. Участки без кровеносных сосудов чередовались с участками, содержащими единичные сосуды (в опухоли по 1–2 сосуда в поле зрения) или группы кровеносных сосудов (в тканях, окружающих опухоль, по 5–7 сосудов) (см. рис. 1). В тканях вокруг опухоли местами наблюдалось много предсуществовавших кровеносных сосудов крупного диаметра.

На 10-е сутки после перевивки рост опухолей продолжается, увеличивается их средний объем (табл. 1).

Морфологическая картина опухолей существенно не отличается от картины в предыдущий срок. Опухолевые клетки инфильтрируют окружающие ткани; в некоторых участках опухоли обнаруживаются фигуры митоза, вокруг некоторых опухолей несколько сильнее, чем в предыдущий срок, выражена лимфомакрофагальная реакция; среди участков жизнеспособной ткани сохраняются участки некрозов разной величины, кровеносные сосуды в опухоли и в окружающих тканях обнаруживаются с той же частотой (рис. 2).

Торможение роста опухоли во 2-й группе на 1-е сутки после окончания 5-кратного введения препарата составило 59 % (7-е сутки после перевивки опухоли)

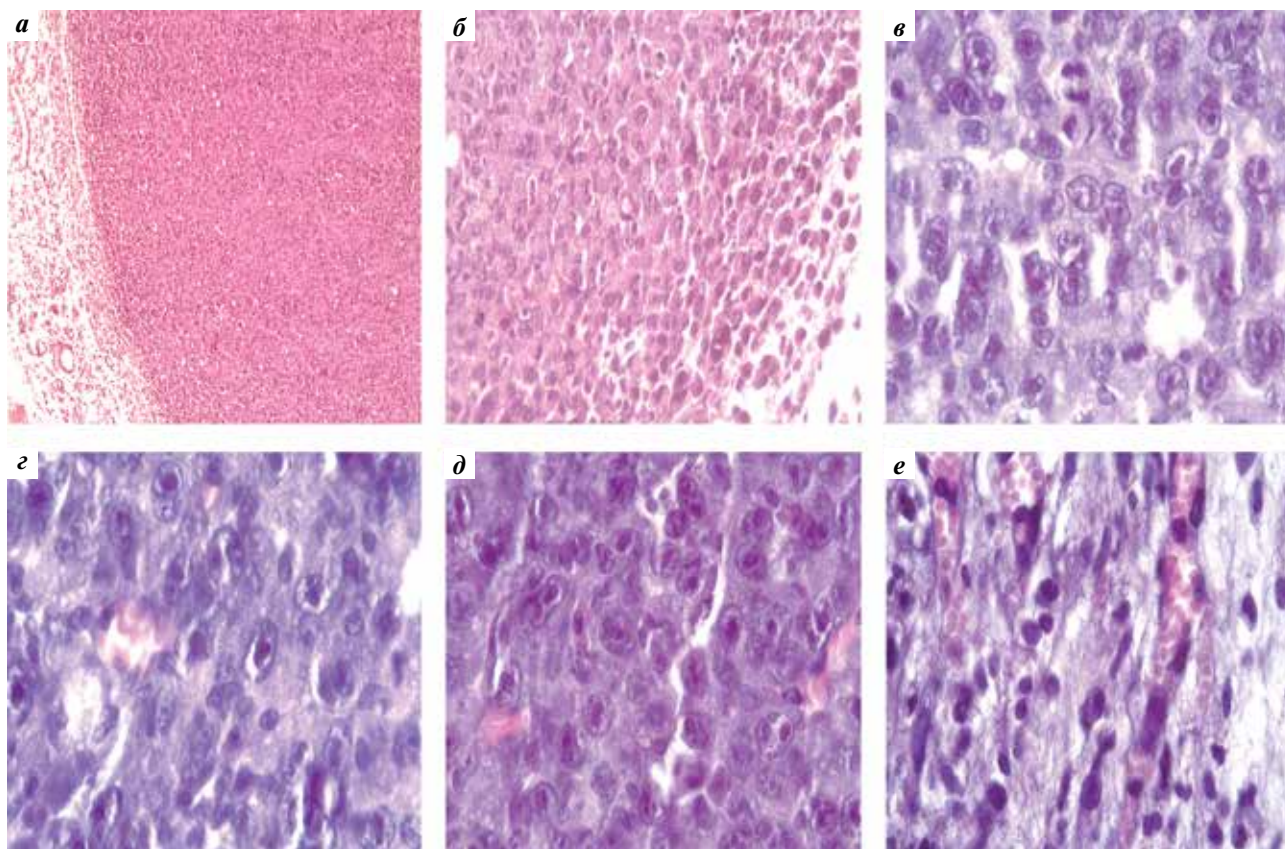


Рис. 1. Контроль. Опухоль LLC на 7-е сутки после перевивки (окраска гематоксилином и эозином): а — общий вид опухоли LLC с окружающей рыхлой соединительной тканью ($\times 100$); б — инвазия опухолевых клеток в окружающую ткань, 3 кровеносных сосуда среди полиморфных опухолевых клеток ($\times 400$); в — полиморфные опухолевые клетки с крупным светлым ядром и крупным ядрышком, 2 митоза ($\times 1000$); г — 3 кровеносных сосуда разного диаметра среди опухолевых клеток ($\times 1000$); д — 2 кровеносных сосуда среди полиморфных опухолевых клеток ($\times 1000$); е — кровеносные сосуда в рыхлой соединительной ткани, граничащей с опухолью ($\times 400$). Здесь и на рис. 2–6: LLC — карцинома легкого Льюис

Fig. 1. Control. Tumor LLC on the 7th day after inoculation (staining with hematoxylin and eosin): а — general view of the LLC tumor with surrounding loose connective tissue ($\times 100$); б — invasion of tumor cells into the surrounding tissue; three blood vessels among polymorphic tumor cells ($\times 400$); в — polymorphic tumor cells with a large light nucleus and a large nucleolus, two mitoses ($\times 1000$); г — three blood vessels of different diameters among tumor cells ($\times 1000$); д — two blood vessels among polymorphic tumor cells ($\times 1000$); е — blood vessels in the loose connective tissue bordering the tumor ($\times 400$). Here and on fig. 2–6: LLC—Lewis lung carcinoma

и увеличилось к последующим 3-м суткам до 70 % (10-е сутки после перевивки) (см. табл. 1).

При гистологическом исследовании образцов опухоли 2-й группы на 1-е сутки после окончания введения ЛХС-1269 в опухолевых узелках, окруженных рыхлой соединительной или жировой тканью, среди участков жизнеспособных опухолевых клеток обнаруживали участки опухолевых клеток с признаками дистрофии и дегенерации (крупные клетки с крупными светлыми или пикноморфными ядрами, клетки с вакуолизацией ядер, цитоплазмы и в состоянии лизиса). Митозы обнаруживали крайне редко. Кровеносные сосуды внутри опухолей визуализировались редко, а на периферии опухоли и в окружающих тканях обнаруживались чаще, но неравномерно (рис. 3). Следует заметить, что, в отличие от контроля, в большинстве опухолей отсутствовали характер-

ные массивные очаги некроза. Это отмечено и другими авторами для других препаратов [19, 20].

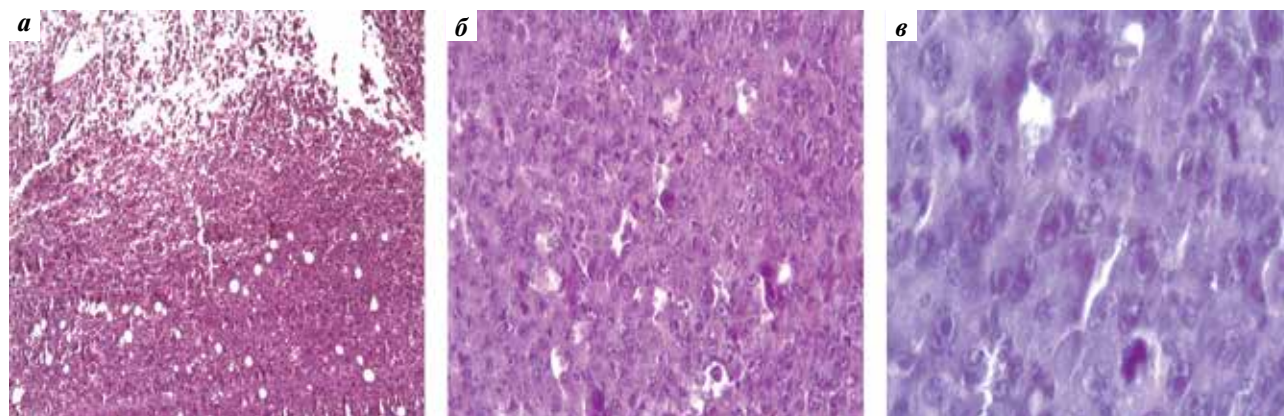
На 3-и сутки после 5-кратного внутрибрюшинного введения препарата процесс повреждения опухоли продолжается: выявляется большое число поврежденных и погибших опухолевых клеток (рис. 4), во многих опухолях обнаруживаются очажки микронекроза и участки разрежения клеток опухоли, а на периферии части опухолей выражена соединительнотканная реакция в виде многих рядов коллагеновых волокон, фибробластов и макрофагов между ними. В отличие от предыдущего срока опыта, в этот срок митотические фигуры обнаруживаются чаще, но реже, чем в контроле. Отмечается набухание стенок кровеносных сосудов опухоли, а также запустевание части сосудов.

Торможение роста опухоли в 3-й группе на 5-е сутки после окончания введения ЛХС-1269 (7-е сутки

Таблица 1. Противоопухолевая эффективность ЛХС-1269 на модели карциномы легких Льюис

Table 1. LHS-1269 antitumor effect against Lewis lung carcinoma

Группа опыта Experience group	Сроки оценки эффекта Effect evaluation time		Средний объем опухоли, $M \pm m$, mm^3 Mean tumor volume, $M \pm m$, mm^3	Торможение роста опухоли, %, Tumor growth inhibition, %
	После перевивки опухоли After tumor transplantation	После окончания введения препарата After the end of the drug administration		
Контроль Control	7-е сутки 7 th day	—	163,5 \pm 22,0	—
	10-е сутки 10 th day	—	1837,0 \pm 332,9	—
ЛХС-1269 60 мг/кг \times 5 (в/б) LHS-1269 60 mg/kg \times 5 (i/p)	7-е сутки 7 th day	1-е сутки 1 st day	68,3 \pm 14,6*	59
	10-е сутки 10 th day	3-и сутки 3 rd day	558,0 \pm 106,6*	70
ЛХС-1269 100 мг/кг \times 1 (в/в) LHS-1269 100 mg/kg \times 1 (i/v)	7-е сутки 7 th day	5-е сутки 5 th day	54,6 \pm 12,5*	67
	10-е сутки 10 th day	8-е сутки 8 th day	383,5 \pm 92,7*	79

*Статистически значимые различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.*Statistically significant differences compared to control, $p \leq 0.05$.**Примечание.** Здесь и в табл. 2, 3: в/б — внутрибрюшинно; в/в — внутривенно; $M \pm m$ — среднее значение \pm стандартное отклонениеNote. Here and in tables 2, 3: i/p — intraperitoneal; i/v — intravenously; $M \pm m$ — arithmetic mean \pm standard deviation**Рис. 2.** Контроль. Опухоль LLC на 10-е сутки после перевивки (окраска гематоксилином и эозином): а — общий вид опухоли LLC с окружающей тканью, инфильтрированной лимфомакрофагальными элементами и опухолевыми клетками ($\times 400$); б — погибшие опухолевые клетки и кровеносные сосуды в опухоли ($\times 400$); в — 3 фигуры митоза в ткани опухоли ($\times 1000$)**Fig. 2.** Control. Tumor LLC on the 10th day after inoculation (staining with hematoxylin and eosin): а — general view of the LLC tumor with surrounding tissue infiltrated with lymphomacrophage elements and tumor cells ($\times 400$); б — dead tumor cells and blood vessels in the tumor ($\times 400$); в — three mitotic figures in the tumor tissue ($\times 1000$)

после перевивки) составило 67 % и увеличилось к 8-м суткам после окончания введения препарата (10-е сутки после перевивки) до 79 % (см. табл. 1).

Хотя гистологическое исследование проведено на 5-е и 8-е сутки после однократного внутривенного введения, изменения в опухолях достаточно четкие. В отличие от контроля, наблюдали выраженное уменьшение площади среза опухолей, разрастание

рыхлой соединительной ткани вокруг опухоли и между опухолевыми узелками, отсутствие или слабую инвазию опухолевых клеток в окружающие ткани, отсутствие или минимальный размер очагов некроза (только 3 из 8 опухолей имели небольшие очаги некроза); митозы обнаруживали крайне редко; дистрофические и деструктивные изменения опухолевых клеток выражались в пикнозе или вакуолизации ядер,

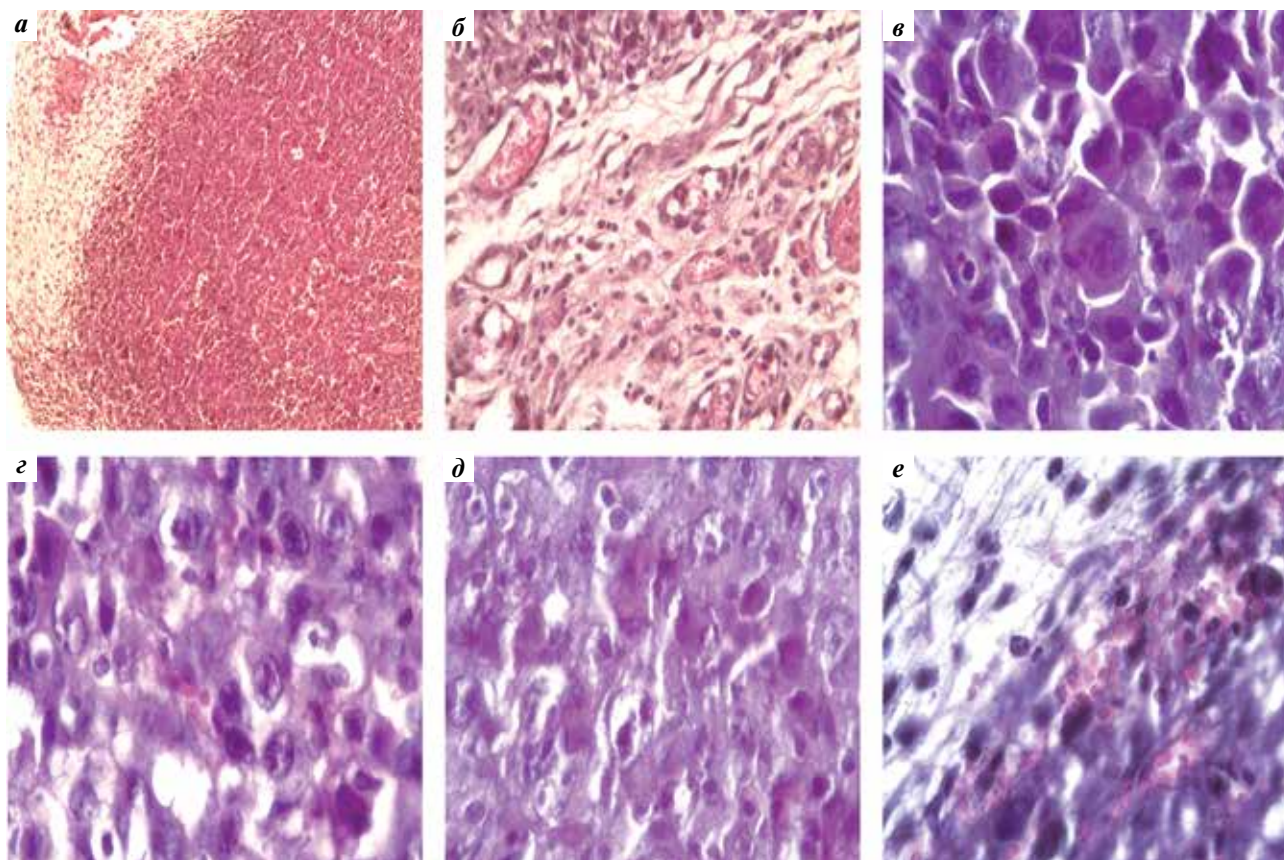


Рис. 3. Изменения в опухоли LLC на 1-е сутки после 5-кратного внутрибрюшинного введения ЛХС-1269 (7-е сутки после перевивки) (окраска гематоксилином и эозином): а — край опухоли с прилегающей рыхлой соединительной тканью ($\times 100$); б — кровеносные сосуды и лимфомакрофагальные элементы в рыхлой соединительной ткани, граничащей с опухолью ($\times 100$); в — полиморфные опухолевые клетки с пикноморфными ядрами ($\times 1000$); г — кровеносные сосуды среди поврежденных опухолевых клеток ($\times 1000$); д — увеличение, вакуолизация и пикноз ядер опухолевых клеток ($\times 1000$); е — кровеносные сосуды в краевой зоне опухоли ($\times 400$)

Fig. 3. Changes in the LLC tumor on the 1st day after 5-fold intraperitoneal injection of LHS-1269 (7th day after inoculation) (staining with hematoxylin and eosin): а — edge of the tumor with adjacent loose connective tissue ($\times 100$); б — blood vessels and lymphomacrophage elements in the loose connective tissue bordering the tumor ($\times 100$); в — polymorphic tumor cells with pycnomorphic nuclei ($\times 1000$); г — blood vessels among damaged tumor cells ($\times 1000$); д — enlargement, vacuolization and pycnosis of tumor cell nuclei ($\times 1000$); е — blood vessels in the marginal zone of the tumor ($\times 400$)

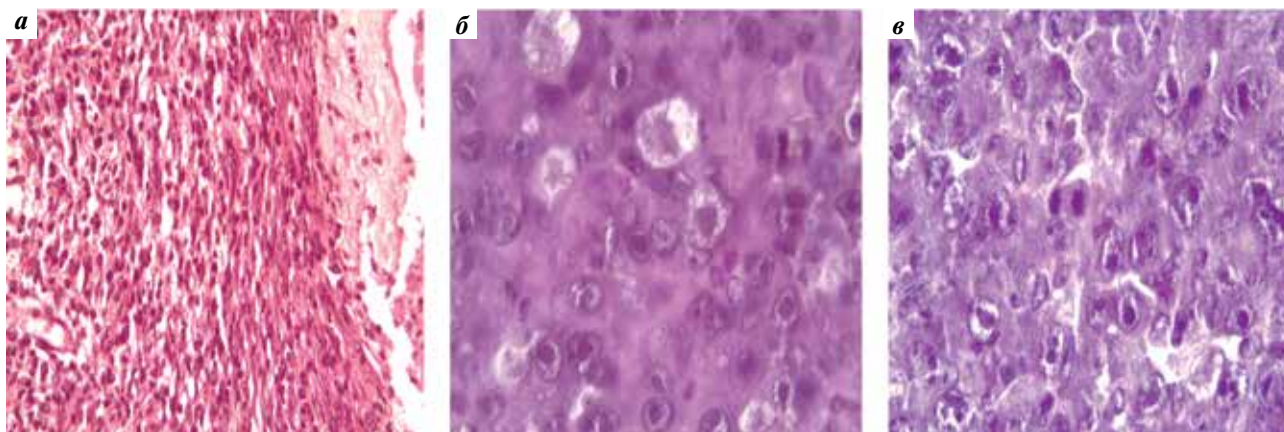


Рис. 4. Изменения в опухоли LLC на 3-и сутки после 5-кратного внутрибрюшинного введения ЛХС-1269 (10-е сутки после перевивки) (окраска гематоксилином и эозином): а — участок соединительнотканной реакции в виде нескольких рядов коллагеновых волокон, фибробластов и макрофагов между ними ($\times 400$); б — участок микронекроза и разрежения клеток опухоли ($\times 400$); в — митоз опухолевой клетки ($\times 1000$)

Fig. 4. Changes in the LLC tumor on 3rd day after 5-fold intraperitoneal injection of LHS-1269 (10th day after inoculation) (staining with hematoxylin and eosin): а — area of connective tissue reaction in the form of several rows of collagen fibers, fibroblasts and macrophages between them ($\times 400$); б — area of micro necrosis and rarefaction of tumor cells ($\times 400$); в — mitosis of a tumor cell ($\times 1000$)

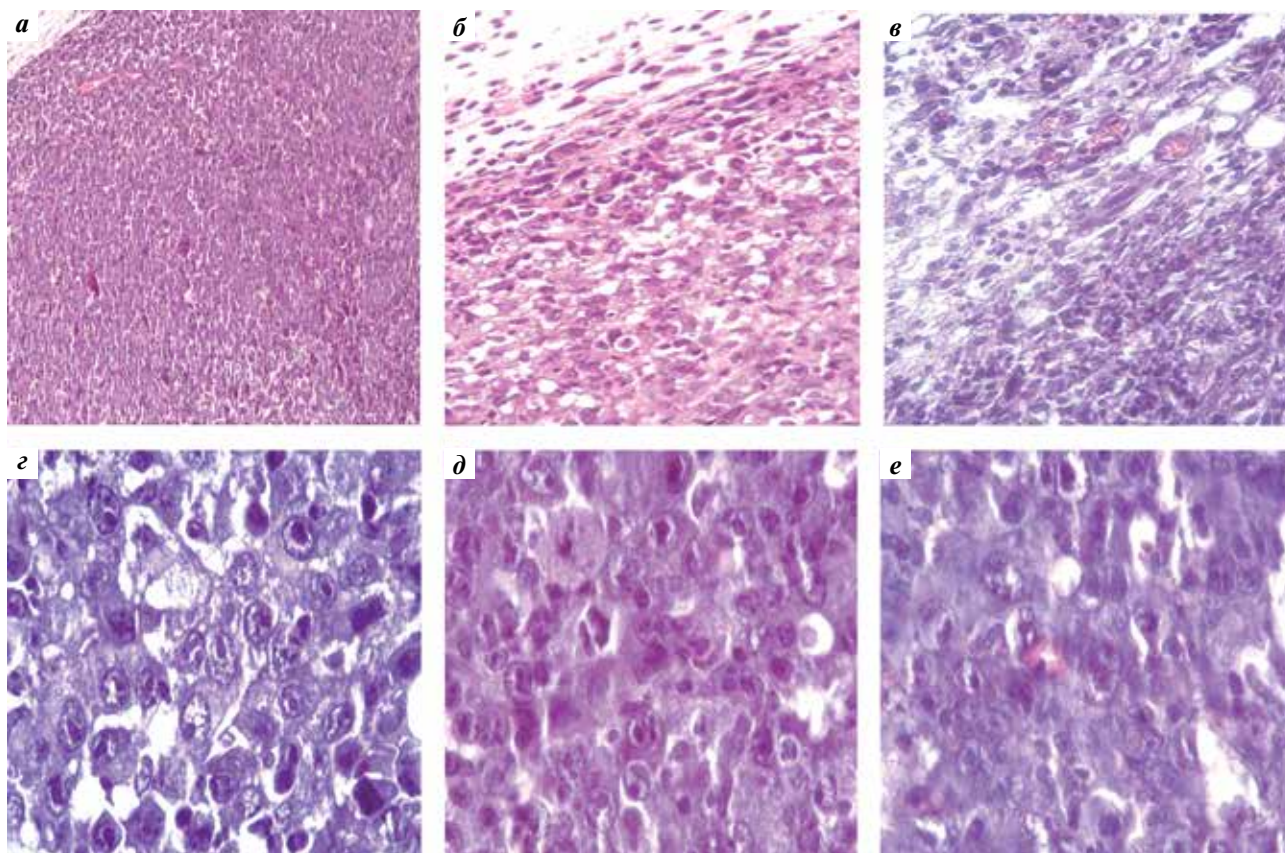


Рис. 5. Изменения в опухоли LLC на 5-е сутки после однократного внутривенного введения ЛХС-1269 (7-е сутки после перевивки) (окраска гематоксилином и эозином): а – общий вид опухоли LLC, участки рыхлого строения (разрежений) опухолевой ткани и кровеносные сосуды на периферии опухоли ($\times 100$); б – соединительнотканная капсула из параллельных рядов фибробластов и волокнистых структур, рыхлое строение опухоли на периферии ($\times 400$); в – кровеносные сосуды разного калибра и лимфомакрофагальная инфильтрация в рыхлой соединительной ткани, окружающей опухоль ($\times 400$); г – деструктивные изменения и увеличение размеров опухолевых клеток, снижение плотности их расположения ($\times 1000$); д – лизис ядра опухолевой клетки, пикноз и распад ядер опухолевых клеток ($\times 1000$); е – кровеносный сосуд (капилляр) среди измененных опухолевых клеток ($\times 1000$)

Fig. 5. Changes in the LLC tumor on 5th day after a single intravenous injection of LHS-1269 (7th day after inoculation) (staining with hematoxylin and eosin): а – general view of the LLC tumor, areas of loose structure (discharges) of the tumor tissue and blood vessels on the periphery of the tumor ($\times 100$); б – connective tissue capsule of parallel rows of fibroblasts and fibrous structures, loose structure of the tumor on the periphery of the tumor ($\times 400$); в – blood vessels of different calibers and lymphohistiocytic infiltration in the loose connective tissue surrounding the tumor ($\times 400$); г – destructive changes and an increase in the size of tumor cells, a decrease in their density ($\times 1000$); д – lysis of the nucleus of the tumor cell, pyknosis and disintegration of the nuclei of the tumor cells ($\times 1000$); е – blood vessel (capillary) among altered tumor cells ($\times 1000$)

увеличении ядер с конденсацией хроматина, лизисе опухолевых клеток (рис. 5). Кроме того, характерным для большинства опухолей этой группы было появление крупных клеток с оксифильной широкой удлиненной цитоплазмой и овальным ядром, похожих на гигантские фибробласты. Морфологическая картина опухолей этой группы в целом была характерной для частично рассасывающихся опухолей разных штаммов под влиянием противоопухолевых препаратов. Расположение кровеносных сосудов как в опухоли, так и в прилежащей к ней рыхлой соединительной ткани, как и в контроле, было неравномерным.

На 8-е сутки после однократного внутривенного введения ЛХС-1269 микроскопическая картина несколько отличалась от предыдущей. В опухолях участки плотного строения, состоящие из относительно

мономорфных клеток со светлыми ядрами, чередовались с участками более рыхлого строения. Следует отметить, что крупные фибробластоподобные клетки обнаруживали крайне редко. В некоторых опухолях ближе к центру наблюдали участки начального склероза стромы. В целом в этот срок выявляется еще много поврежденных и погибших опухолевых клеток, а в окружающих тканях и внутри очагов некроза выражена лимфомакрофагальная инфильтрация (рис. 6). Также в этот срок в некоторых участках опухоли обнаруживали фигуры митоза. Кровеносные сосуды, расположенные в опухоли, были редки, отмечалось запустевание части из них (лишены крови).

Таким образом, морфологическое исследование показало, что ЛХС-1269 в примененных дозах и режимах обладает достаточно выраженным цитотоксическим

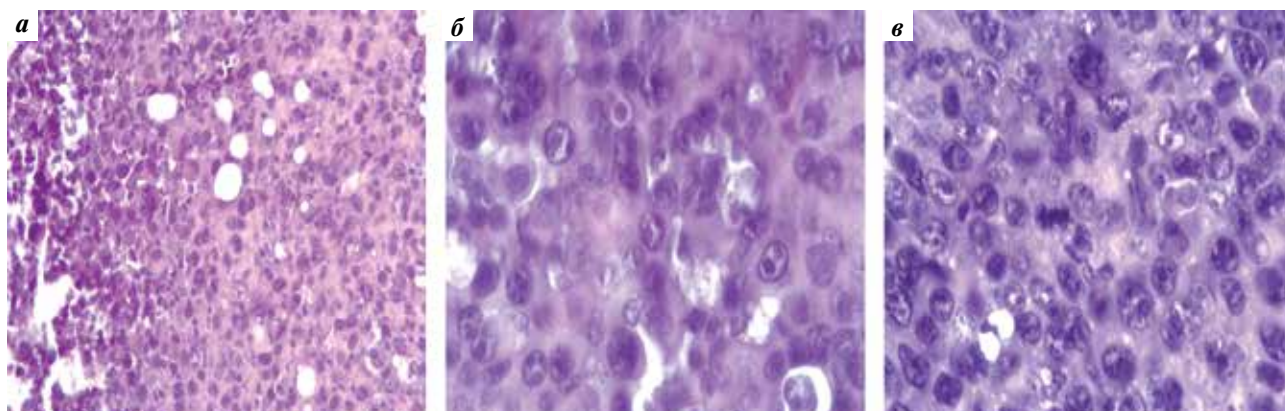


Рис. 6. Изменения в опухоли LLC на 8-е сутки после однократного внутривенного введения ЛХС-1269 (окраска гематоксилином и эозином): а — на периферии опухоли — плотное расположение жизнеспособных опухолевых клеток и лимфоидно-макрофагальных элементов ($\times 400$); б — кровеносный сосуд среди поврежденных и неповрежденных опухолевых клеток ($\times 1000$); в — митотические фигуры и мелкие кровеносные сосуды среди опухолевых клеток ($\times 1000$)

Fig. 6. Changes in the LLC tumor on the 8th day after a single intravenous injection of LHS-1269 (staining with hematoxylin and eosin): а — dense arrangement of viable tumor cells and lymphoid-macrophage elements on the periphery of the tumor ($\times 400$); б — blood vessel among damaged and undamaged tumor cells ($\times 1000$); в — mitotic figures and small blood vessels among tumor cells ($\times 1000$)

действием на перевиваемой карциноме LLC мышей. В нашем опыте ЛХС-1269 при однократном и 5-кратном введении мышам наряду с высоким торможением роста вызывал морфологические изменения в исследованных опухолях: повреждение и гибель многих опухолевых клеток, торможение пролиферации (практически полное исчезновение митотических фигур), инвазию опухолевых клеток, разрастание рыхлой соединительной ткани как на 1-е и 3-и сутки после окончания 5-кратного внутрибрюшинного введения, так и на 5-е и 8-е сутки после однократного внутривенного введения. О снижении скорости пролиферации опухолевых клеток под влиянием ЛХС-1269 можно косвенно судить и по уменьшению площади зон некроза в опухолях по сравнению с опухолями контрольной группы. В перевиваемых опухолях очаги некроза развиваются, как известно, вследствие гипоксии, так как образование новых кровеносных сосудов может отставать от размножения самих опухолевых клеток. Морфологические изменения в опухоли LLC были сходны с изменениями в перевиваемых опухолях (включая и опухоль LLC) при действии цитотоксических противоопухолевых препаратов разных классов и наблюдаемыми при изучении патоморфоза разных солидных злокачественных опухолей [17, 19, 20].

Для уточнения предположения об антиангиогенном механизме действия ЛХС-1269 в гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, провели визуальный подсчет кровеносных сосудов в опухоли и окружающих ее тканях при увеличении $\times 1000$, при этом подсчету подвергали хорошо видимые округлые, овальные и несколько вытянутые кровеносные сосуды замкнутого типа, содержащие эритроциты (эритроцит). Кроме того, в препаратах,

окрашенных маркером эндотелия CD31, провели наиболее полное иммуногистохимическое выявление и подсчет микрососудов (эндотелиальных клеток) на 1 поле зрения микроскопа при увеличении микроскопа $\times 200$.

Результаты визуального подсчета кровеносных сосудов в опухоли и окружающей рыхлой соединительной ткани представлены в табл. 2.

ЛХС-1269 в обоих режимах применения (2-я и 3-я группы) вызвал статистически значимое снижение числа кровеносных сосудов в опухоли. В прилежащей к опухоли соединительной ткани статистически значимое снижение числа кровеносных сосудов отмечено только во 2-й группе.

Результаты иммуногистохимического окрашивания CD31⁺ микрососудов в опухоли LLC в участках максимальной плотности при увеличении $\times 200$ после применения ЛХС-1269, представленные в табл. 3, показали, что отмеченное снижение среднего числа CD31⁺-микрососудов во 2-й группе было статистически незначимым по сравнению с контролем. Увеличение этого показателя в 3-й группе было статистически значимым по сравнению с контролем.

При сопоставлении результатов визуального и иммуногистохимического подсчета кровеносных микрососудов на 8-е сутки после перевивки опухолей как в контроле, так и при применении ЛХС-1269 в обоих режимах обнаружены различия в среднем количестве микрососудов (средних числах). Это вполне объяснимо большей чувствительностью иммуногистохимического метода и различиями в использовании разрешающей способности микроскопа. Визуально при увеличении микроскопа $\times 1000$ и окраске гематоксилином и эозином мы могли

Таблица 2. Среднее число кровеносных сосудов в карциноме легкого Льюис и окружающей соединительной ткани после применения ЛХС-1269
Table 2. Mean number of blood vessels in Lewis lung carcinoma and surrounding loose connective tissue after application of LHS-1269

Группа опыта Experience group	Срок оценки эффекта Effect evaluation time		Среднее число кровеносных сосудов, $M \pm m$ Average number of blood vessels, $M \pm m$	
	После перевивки опухоли After tumor transplantation	После окончания введения препарата After the end of the drug administration	Опухоль Tumor tissue	Соединительная ткань Connective tissue
Контроль Control	8-е сутки 8 th day	—	$0,78 \pm 0,43$ ($n = 10$)	$1,31 \pm 0,73$ ($n = 10$)
ЛХС-1269 60 мг/кг \times 5 (в/б) LHS-1269 60 mg/kg \times 5 (i/p)	8-е сутки 8 th day	1-е сутки 1 st day	$0,45 \pm 0,23^*$ ($n = 9$)	$0,67 \pm 0,31^*$ ($n = 8$)
ЛХС-1269 100 мг/кг \times 1 (в/в) LHS-1269 100 mg/kg \times 1 (i/v)	8-е сутки 8 th day	5-е сутки 5 th day	$0,36 \pm 0,22^*$ ($n = 8$)	$1,00 \pm 0,81$ ($n = 9$)

*Статистически значимые различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

*Statistically significant differences compared to control, $p \leq 0.05$.

Примечание. Здесь и в табл. 3: n — число опухолей (мышей).

Note. Here and in table 3: n — number of tumors (mice).

Таблица 3. Результаты иммуногистохимического окрашивания CD31⁺-микрососудов в опухоли (карциноме легкого Льюис) после применения ЛХС-1269
Table 3. Results of immunohistochemical staining of CD31⁺ microvessels in tumor (Lewis lung carcinoma) after application of LHS-1269

Группа опыта Experience group	Срок оценки эффекта Effect evaluation time		Среднее число CD31 ⁺ -микрососудов, $M \pm m$ Mean number of CD31 ⁺ microvessels, $M \pm m$
	После перевивки опухоли After tumor transplantation	После окончания введения препарата After the end of the drug administration	
Контроль Control	8-е сутки 8 th day	—	$59,6 \pm 18,9$ ($n = 10$)
ЛХС-1269 60 мг/кг \times 5 (в/б) LHS-1269 60 mg/kg \times 5 (i/p)	8-е сутки 8 th day	1-е сутки 1 st day	$56,1 \pm 16,1$ ($n = 9$)
ЛХС-1269 100 мг/кг \times 1 (в/в) LHS-1269 100 mg/kg \times 1 (i/v)	8-е сутки 8 th day	5-е сутки 5 th day	$83,1 \pm 8,7^*$ ($n = 8$)

*Статистически значимые различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

*Statistically significant differences compared to control, $p \leq 0.05$.

видеть и подсчитывать лишь микрососуды диаметром от 3—8 до 40 мкм и более, образованные 1—2 эндотелиальными клетками и содержащие эритроциты. Кроме того, подсчет сосудов проводили в случайных полях зрения микроскопа по всей площади среза. При иммуногистохимическом исследовании выявляется значительно больше мелких микрососудов разной формы и величины (от 1—2 мкм) в участках максимальной плотности микрососудов. Иммуногистохимическое исследование показало, что соединение ЛХС-1269 на 1-е сутки после 5-кратного внутрибрюшинного введения не проявило антиангиогенного действия в опухоли LLC, а на 5-е сутки после его однократного внутривенного применения

вызвало стимулирование ангиогенеза. Визуальное исследование плотности микрососудов в LLC при применении ЛХС-1269 в тех же режимах и дозах в те же сроки показало некоторый антиангиогенный эффект.

Заключение

Учитывая результаты морфологического исследования опухоли LLC и высокий процент ТРО, можно заключить, что ЛХС-1269 обладает цитотоксическим действием. При этом ЛХС-1269 в режиме однократного и 5-кратного введения мышам вызывает выраженные морфологические изменения в виде повреждений и гибели многих опухолевых клеток, изменения

структуры опухоли LLC. Также вместе с опухолевыми клетками происходят прямое повреждение и гибель некоторой части более крупных кровеносных сосудов или их участков. Более мелкие микрососуды и отдельные эндотелиальные клетки, определяемые иммуно-

гистохимическим методом, сохраняются, и наблюдается неоангиогенез. Результаты исследования ангиогенеза в опухоли не позволяют сделать вывод об антиангиогенном механизме действия ЛХС-1269 в перевиваемой карциноме легкого LLC мышей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Голубева И.С., Яворская Н.П., Еремина В.И. и др. Противоопухолевая активность гликозидов индолокарбазолов. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):23–4. Golubeva I.S., Yavorskaya N.P., Eremina V.I. et al. Antitumor activity of indolocarbazole glycosides. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(1):23–4 (In Russ.).
2. Яворская Н.П., Голубева И.С., Эктова Л.В. и др. Противоопухолевая активность индолокарбазола ЛХС-1269. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):125–6. Yavorskaya N.P., Golubeva I.S., Ektova L.V. et al. Antitumor activity of indolocarbazole LHS-1269. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(1):125–6. (In Russ.).
3. Голубева И.С., Еремина В.И., Тихонова Н.И. и др. Изучение противоопухолевой активности индолокарбазола ЛХС-1269 на раке легкого LLC, режимы и способы введения. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(S):21. Golubeva I.S., Eremina V.I., Tikhonova N.I. et al. Study of the antitumor activity of indolocarbazole LHS-1269 on lung cancer LLC, modes and methods of administration. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(S):21. (In Russ.).
4. Vartanian A., Golubeva I., Shprakh Z. Is vasculogenic mimicry a hallmark of an aggressive tumor? In: Horizons in cancer research. V. 65. Ed. by Y.S. Watanabe. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2017. P. 13–33.
5. Зенков Р.Г., Фетисов Т.И., Эктова Л.В. и др. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности производных N-гликозидов индолокарбазолов ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4S):87. Zenkov R.G., Fetisov T.I., Ektova L.V. et al. Molecular mechanisms of antitumor activity of derivatives of N-glycosides of indolocarbazoles LHS-1208 and LHS-1269. Uspekhi molekularnoy onkologii = Advances in molecular oncology 2018;5(4S):87.
6. Acero N., Braña M.F., Añorbe L. et al. Synthesis and biological evaluation of novel indolocarbazoles with anti-angiogenic activity. Eur J Med Chem 2012;48(2):108–13. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.11.040
7. Kerbel R.S. Tumor angiogenesis. N Engl J Med 2008;358(19):2039–49. DOI: 10.1056/NEJMed0706596
8. Сеньчукова М.А., Макарова Е.В., Калинин Е.А., Ткачев В.В. Современные представления о происхождении, особенностях морфологии, прогностической и предиктивной значимости опухолевых сосудов. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(1):6–15. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-6-15 Senchukova M.A., Makarova E.V., Kalinin E.A., Tkachev V.V. Modern ideas about the origin, features of morphology prognostic and predictive significance of tumor vessels. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(1):6–15. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-6-15
9. Иванов А.И., Пучиньян Д.М., Норкин И.А. Роль эндотелиальных клеток в ангиогенезе. Успехи современной биологии 2015;136(5):491–505. Ivanov A.I., Puchin'yan D.M., Norkin I.A. The role of endothelial cells in angiogenesis. Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Modern Biology 2015;136(5):491–505. (In Russ.).
10. Григорьева И.Н., Харатишвили Т.К., Барышников А.Ю. Васкулогенная мимикрия – альтернативный механизм кровоснабжения опухоли? Российский биотерапевтический журнал 2011;10(3):25–9. Grigorieva I.N., Kharatishvili T.K., Baryshnikov A.Yu. Vasculogenic mimicry – an alternative mechanism of tumor blood supply? Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2011;10(3):25–9.
11. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой. 4-е изд., доп. и перераб. М.: Практическая медицина, 2015. С. 41–48. Guide to chemotherapy of tumor diseases. Ed. by N.I. Perevodchikova. 4th edn., updated and revised. Moscow: Prakticheskaya Meditsina, 2015. P. 41–48. (In Russ.).
12. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза и апоптоза. Российский биотерапевтический журнал 2011;10(3):17–24. Blokhin D.Y., Chmutin E.F., Ivanov P.K. Molecular targets for anticancer therapy: growth factors, angiogenesis and apoptosis. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2011;10(3):17–24. (In Russ.).
13. Ливанова А.А., Деев Р.В., Ризванов А.А. Современные методы исследования ангиогенеза в эксперименте. Гены и клетки 2015;10(1):115–27. Livanova A.A., Deev R.V., Rizvanov A.A. Modern methods for the study of angiogenesis in the experiment. Geny i kletki = Genes and Cells 2015;10(1):115–27. (In Russ.).
14. Горбань Н.Е., Корякин О.Б., Попов А.М. и др. Роль морфологических показателей внутриопухолевых микрососудов и пролиферативной активности опухолевых клеток при почечно-клеточном раке. Онкоурология 2012;8(4):10–4. DOI: 10.17650/1726-9776-2012-8-4-10-14 Gorban N.E., Koryakin O.B., Popov A.M. et al. The role of morphological parameters of intratumoral microvessels and proliferative activity of tumor cells in renal cell carcinoma. Onkourologiya = Oncourology 2012;8(4):10–4. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2012-8-4-10-14
15. Спринджук М.В. Ангиогенез и цифровая патология. Доступно по: https://oncology.ru/specialist/journal_oncology/arch

- ive/0211/001/?ysclid=lasqywgmsy404775687.
Sprindzukn M.V. Angiogenesis and digital pathology. Available at: https://oncology.ru/specialist/journal_oncology/archive/0211/001/?ysclid=lasqywgmsy404775687. (In Russ.).
16. Никитенко Н.В., Сеньчукова М.А., Томчук О.Н. и др. Морфологическая характеристика и прогностическое значение разных типов сосудов при раке молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(3):15–22. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-22. Nikitenko N.V., Senchukova M.A., Tomchuk O.N. et al. Morphological characteristic and clinical value of different types of tumor vessels in breast cancer. Rossiyskiy bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(3):15–22. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-22
 17. Хоченков Д.А., Сапрыкина Н.С., Барышникова М.А. и др. Новый механизм действия аранозы — блокада неоангиогенеза. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2015;3:71–5. Khochenkov D.A., Saprykina N.S., Baryshnikova M.A. et al. A new mechanism of action of aranzose — blockade of neoangiogenesis. Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina = Journal of N.N. Blokhin Russian Oncology Center 2015;3:71–5. (In Russ.).
 18. Федосеева В.В., Постовалова Е.А., Халанский В.А. и др. Лекарственный патоморфоз глиобластомы 101,8 у крыс линии Wistar при лечении наноразмерной формой доxorубина на основе полилактидных наночастиц. Современные технологии в медицине 2018;10(4):105–12. DOI: 10.17691/stm2018.10.4.12. Fedoseeva V.V., Postovalova E.A., Khalansky V.A. et al. Drug-induced pathomorphosis of glioblastoma 101.8 in Wistar rats treated with doxorubicin bound to poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. Sovremennye tehnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine 2018;10(4):105–12. (In Russ.). DOI: 10.17691/stm2018.10.4.12
 19. Плотникова Н.А., Пятаев Н.А., Канаев П.М. и др. Особенности морфологии карциномы легкого Льюиса на фоне коррекции опухолевого роста мелатонином и 3-гидроксипиридином. Фундаментальные исследования 2014;(10-3):549–52. Plotnikova N.A., Pyataev N.A., Kanaev P.M. et al. Features of the morphology of Lewis lung carcinoma against the background of correction of tumor growth with melatonin and 3-hydroxypyridine. Fundamentalnye issledovaniya = Basic Research 2014;(10-3):549–52.
 20. Джадранов Е.С., Ергазина М.Ж., Джангельдина З.Н., Красноштанов А.В. Влияние циклофосфана на развитие экспериментальной перевивной опухоли крыс саркома 45. Вестник КазНМУ 2015;(1):351–3. Dzhadranov E.S., Ergazina M.Zh., Dzhangel'dina Z.N., Krasnoshtanov A.V. Influence of cyclophosphane on the development of an experimental transplantable tumor of sarcoma rats 45. Vestnik KazNMU = Bulletin of Kazakh National Medical University 2015;(1):351–3. (In Russ.).
 21. Грабовий О.М., Тарасова Т.О., Кушубарова М.В. Гистологическая оценка ответа опухоли на химио-/лучевую терапию. Клінічна Онкологія 2012;6(2):138–43. Graboviy O.M., Tarasova T.O., Kushubarova M.V. Histological assessment of tumor response to chemotherapy/radiation therapy. Klinichna onkologiya = Clinical Oncology 2012;6(2):138–43. (In Russ.).
 22. Галахин К.А., Югринов О.Г., Курик Е.Г. и др. Химиотерапевтический патоморфоз злокачественных опухолей. Украинский химиотерапевтический журнал 2000;4:8–12. Galakhin K.A., Yuginov O.G., Kurik E.G. et al. Chemotherapeutic pathomorphosis of malignant tumors. Ukrainskiy khimioterapevticheskiy zhurnal = Ukrainian Journal of Chemotherapy 2000;4:8–12. (In Russ.).
 23. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевых лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильева и др. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–57. [Treshcalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Guidelines for preclinical study of the antitumor activity of drugs. In: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1. Ed. by A.N. Mironov, N.D. Bunyatyan, A.N. Vasil'yev et al. Moscow: Grief i K, 2012. P. 642–57. (In Russ.).
 24. Mayo J.G. Biological characterizations of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. Cancer Chemother Rep (2) 1972;3(1):325–30.

Вклад авторов

И.Б. Меркулова: разработка плана и дизайна исследования, получение и анализ данных, анализ данных литературы, написание, оформление и редактирование статьи;
И.С. Голубева, Т.В. Абрамова: постановка эксперимента, получение данных для анализа;
Д.А. Хоченков: получение данных для анализа, анализ и статистическая обработка данных, написание раздела статьи;
Н.П. Ермакова: статистическая обработка данных;
Л.В. Эктова: автор соединения ЛХС-1269, синтез субстанции, разработка и планирование концепции статьи, редактирование статьи.

Authors' contributions

I.B. Merkulova: developing of the plan and design of the research, data obtaining and analysis, article writing, design and editing of the article;
I.S. Golubeva, T.V. Abramova: experimental set up, obtaining data for analysis;
D.A. Khochenkov: obtaining data for analysis, analysis and statistical data processing, writing of the article section;
N.P. Ermakova: statistical data processing;
L.V. Ektova: author of LHS-1269 compound, synthesis of substance, development and planning of the article concept, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Б. Меркулова / I.B. Merkulova: <https://orcid.org/0000-0001-7461-3422>
И.С. Голубева / I.S. Golubeva: <https://orcid.org/0000-0002-7263-7444>
Д.А. Хоченков / D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>
Т.В. Абрамова / T.V. Abramova: <https://orcid.org/0000-0002-8662-3422>
Н.П. Ермакова / N.P. Ermakova: <https://orcid.org/0000-0002-3125-157X>
Л.В. Эктова / L.V. Ektova: <https://orcid.org/0000-0002-3987-6072>

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

Финансирование. Исследование выполнено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.
Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 28.02.2022. Принята к публикации: 28.10.2022.
Article submitted: 28.02.2022. Accepted for publication: 28.10.2022.