

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КРОВЕНОСНЫХ КАПИЛЛЯРОВ КАРЦИНОСАРКОМЫ WALKER 256 В УСЛОВИЯХ СПОНТАННОГО РОСТА ОПУХОЛИ И ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОБЩЕЙ ГИПЕРТЕРМИИ

Елена Владимировна ОВСЯНКО¹, Наталья Петровна БГАТОВА²,
Яхид Умеровна ОВСЯНКО¹, Геннадий Михайлович ВАКУЛИН¹

¹ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

²НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Изучены ультраструктурные изменения эндотелиоцитов кровеносных капилляров карциносаркомы Walker 256 при спонтанном развитии опухоли и при воздействии общей гипертермии. В работе использовали самцов крыс линии Wistar массой 180–200 г. Суспензию клеток перевиваемой карциносаркомы Walker 256 вводили животным в мышцу бедра в дозе 1×10^6 клеток. Для электронномикроскопического исследования забирали материал опухолевой ткани на 5-й день после трансплантации опухолевых клеток. Выявлено, что воздействие общей гипертермии обуславливает нарушение структуры эндотелиоцитов кровеносных капилляров, расположенных в области опухолевого роста: происходит их набухание, потеря связи с базальной мембраной, разрыхление межэндотелиальных контактов, уменьшение содержания цитоплазматических органелл, набухание митохондрий и мембран гранулярной эндоплазматической сети.

Ключевые слова: карциносаркома Walker 256, эндотелиоциты, общая гипертермия.

В последние десятилетия значительным достижением в области разработки новых эффективных методов терапии злокачественных новообразований явилось создание концепции противоопухолевой терапии, основанной на подавлении ангиогенеза [1]. В настоящее время известно, что важнейшим этапом развития опухоли является ее способность индуцировать и поддерживать ангиогенез. Показано, что в опухоли образуется сосудистая сеть, которая значительно отличается от сосудов здоровой ткани [2, 3]. Кровеносные капилляры опухоли, с морфологической точки зрения, являются атипичными и составляют значительную часть опухолевой стромы. Сосуды могут иметь различную локализацию — преимущественно в области периферии или в центральной части опухолевого роста, что влияет на внутриопухолевый кровоток и может оказывать отрицательное действие на доставку лекарственных препаратов [4].

Одним из основных принципов современной противоопухолевой терапии является разработка таргетных технологий, которые позволяют целенаправленно транспортировать лекарственные препараты непосредственно к злокачественным клеткам или нацелены на определенные «мишени» в опухоли [4], а также сами эндотелиальные

клетки новообразованных сосудов [5]. В качестве перспективной мишени подавления злокачественного роста определен опухолевый ангиогенез. В то же время недостаточно данных об ультраструктурных перестройках эндотелиоцитов кровеносных капилляров опухоли в динамике опухолевого роста и в условиях терапевтического воздействия, что имеет важное значение для определения лекарственной терапии [4, 6].

Целью данной работы было изучение ультраструктурной реорганизации эндотелиоцитов кровеносных капилляров карциносаркомы Walker 256 при спонтанном развитии опухолевого процесса и в условиях воздействия общей гипертермии.

Материалы и методы

В эксперименте использовали самцов крыс линии Wistar ($n = 49$) массой 180–200 г. Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Использовали перевиваемый штамм карциносаркомы Walker 256 (W256), поддерживаемый *in vivo* (лаборатория физиологической генетики Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). Суспензию клеток перевиваемой W256 вводили животным мышцу бедра в дозе

Овсянко Е.В. — к.м.н., доцент, e-mail: Vin_San92@mail.ru

Бгатова Н.П. — д.б.н., проф., руководитель лаборатории ультраструктурных исследований, e-mail: n_bgatova@ngs.ru

Овсянко Я.У. — к.м.н., e-mail: Vin_San92@mail.ru

Вакулин Г.М. — к.м.н., сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории

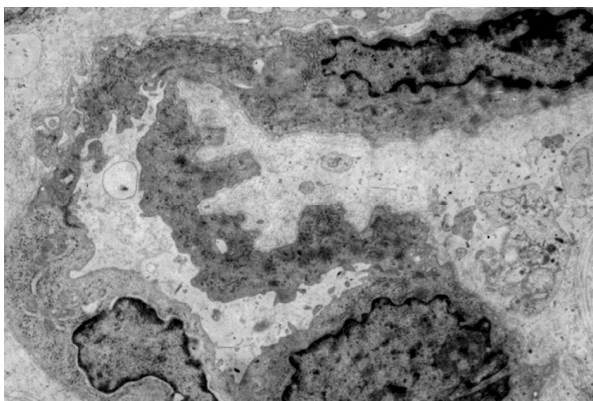
1×10^6 клеток [8]. Через 5 суток с момента перевивки опухоли измеряли ее размеры штангенциркулем в трех взаимно перпендикулярных направлениях и определяли объем. Разогревание животных производили однократно, на 5-е сутки с момента перевивки W256, в полном соответствии со «Способом экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных» [9] при погружении объекта исследования в горячую воду (45°C) до уровня шеи до достижения ректальной температуры $43,5^\circ\text{C}$ (стадия теплового удара). Крыс содержали при фиксированном световом режиме (свет — темнота 12:12 с включением освещения в 8:00 и выключением в 20:00).

Экспериментальные животные были распределены на 3 группы: первая — интактные ($n = 7$), вторая — животные со спонтанным развитием W256 ($n = 21$), третья — животные с W256, получавшие общую гипертермию ($n = 21$). Для электронномикроскопического исследования забирали материал опухолевой ткани при спонтанном развитии опухолевого роста на 5-й, 7-й и 14-й день после трансплантации клеток W256, у животных, получавших общую гипертермию, — на 3-й, 7-й и 14-е сутки с момента проведения процедуры общей гипертермии. Образцы опухоли (по 5 кусочков от каждого животного, величиной 1 мм^3) фиксировали в 4%-ном параформальдегидном фиксаторе на 0,1 М фосфатном буфере Миллонига (pH 7,4) при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем после промывки в охлажденном буфере Миллонига образцы в течение 1 часа дополнительно фиксировали на холоде в 1%-ном осмиевом фиксаторе на 0,2 М какодилатном буфере (pH 7,4) с добавлением 1,5%-ного ферроцианида калия. После дегидратации в серии спиртов возрастающей концентрации образцы заключали в эпоновую смолу. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толуидиновым си-

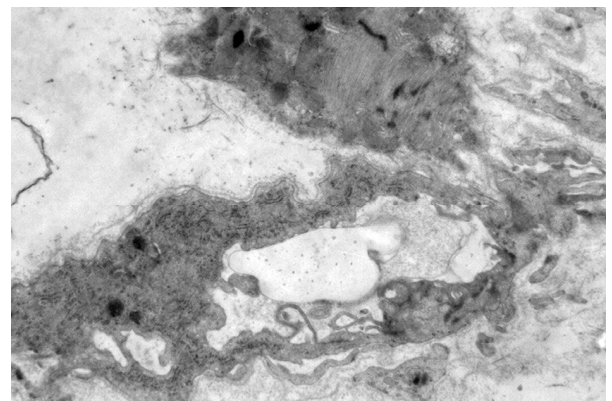
ним, изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки тканей для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 35–45 нм на ультратоме LKB-8800 (Швеция), контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM-1010 (Япония). Морфометрию эндотелиоцитов кровеносных капилляров (по 20 клеток на каждую группу) проводили при конечном увеличении в 32 000 раз с помощью открытой тестовой системы. Полученные цифровые данные обрабатывали с использованием общепринятых методов статистики [10], достоверность различий средних значений определяли на основании t-критерия Стьюдента для уровня достоверности 95 % ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

У животных со спонтанным развитием опухолевого процесса на 5-е сутки после трансплантации опухолевых клеток в структуре кровеносных капилляров отмечали высокий эндотелий с большим содержанием органелл белкового синтеза — цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума, прикрепленных и свободных полисомальных рибосом. Выявляли темные и светлые эндотелиальные клетки и наличие плотных контактов между эндотелиоцитами (рис. 1). Было обнаружено уменьшение объемной плотности микропиноцитозных везикул: люминальных — на 77 %, цитоплазматических — на 70 %, базальных — на 60 % по сравнению с соответствующими показателями эндотелиоцитов кровеносных капилляров мышечной ткани бедра интактных животных. Концентрация крист митохондрий была увеличена на 24 %. Возрастала на 54 % численная плотность прикрепленных рибосом и на 79 % — объемная плотность мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума (рис. 2).



а



б

Рис. 1. Структура эндотелиоцитов кровеносных капилляров карциномы Walker 256 через 3 (а) и 14 (б) суток после трансплантации опухолевых клеток. Повышенное содержание органелл белкового синтеза — цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума и рибосом. Увеличение $\times 8000$

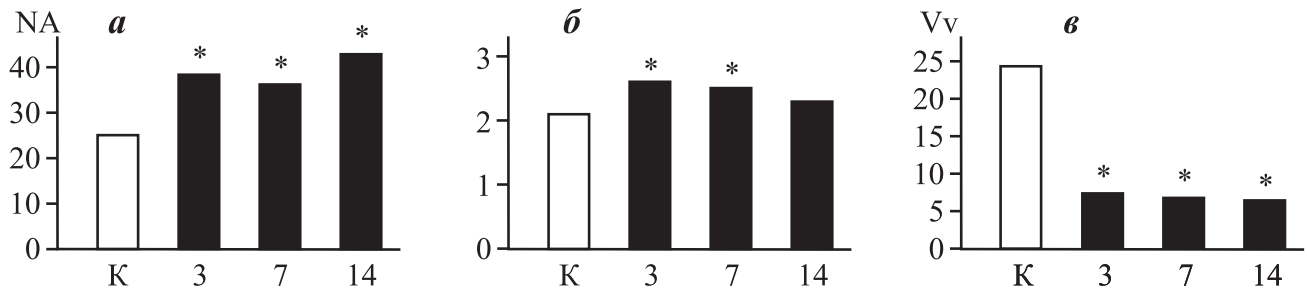


Рис. 2. Содержание органелл в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров в динамике развития карциносаркомы Walker 256.

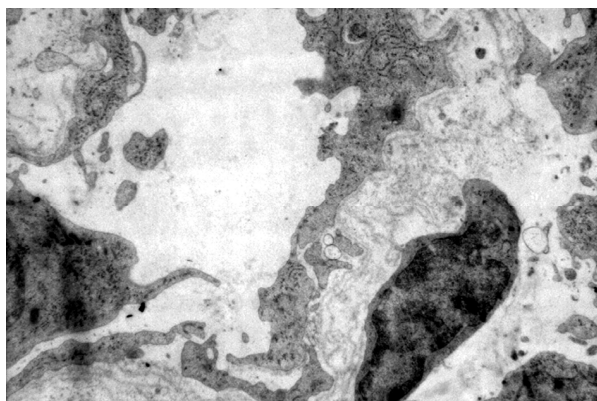
Здесь и на рис. 4: а — численная плотность прикрепленных рибосом (NA, число структур в тестовой площади, $\text{мкм}^0/\text{мкм}^2$), б — концентрация крист митохондрий (отношение поверхностной плотности внутренней мембраны митохондрий, $\text{мкм}^2/\text{мкм}^3$, к поверхностной плотности наружной мембраны митохондрий, $\text{мкм}^2/\text{мкм}^3$), в — объемная плотность цитоплазматических микропиноцитозных везикул (Vv, % от объема цитоплазмы ($\text{мкм}^3/\text{мкм}^3$); обозначение и размерность параметров приведены согласно рекомендациям Международного стереологического общества [11].

К — мышечная ткань бедра интактных животных, 3, 7, 14 — ткань опухоли через 3, 7 и 14 суток после инъекции клеток W256 соответственно; звездочкой (*) отмечены отличия, достоверные относительно соответствующих параметров в мышечной ткани бедра ($p \leq 0,05$)

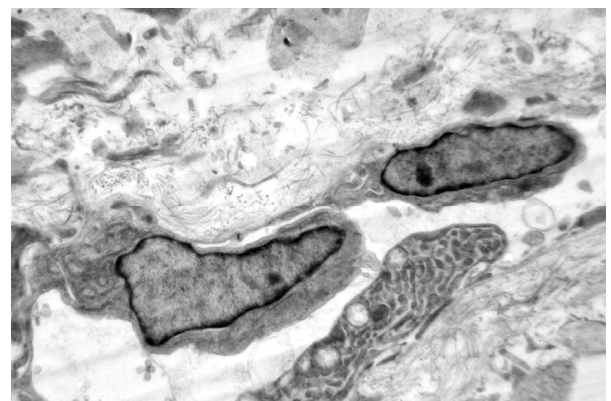
Через 7 суток после трансплантации опухолевых клеток сохранялись сниженными величины объемной плотности микропиноцитозных везикул: люминальных — на 68 %, цитоплазматических — на 70 % и базальных — 53 %. Концентрация крист митохондрий была увеличена на 19 %. Численная плотность прикрепленных рибосом возрастала, по сравнению с соответствующими величинами в контроле, на 44 %, а объемная плотность мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума — на 70 % (см. рис. 2). Не отмечали достоверных различий в структуре эндотелиоцитов кровеносных капилляров через 3 и 7 суток развития опухолевого процесса (см. рис. 2).

Через 14 суток после трансплантации опухолевых клеток в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров, расположенных на периферии опухолевого роста, сохранялись небольшое содержание

микропиноцитозных везикул, повышенное количество рибосом, плотные межэндотелиальные контакты (см. рис. 1, б). При сравнении морфометрических показателей структуры эндотелиоцитов кровеносных капилляров W256 через 14 суток после трансплантации опухолевых клеток с эндотелиоцитами кровеносных капилляров бедра интактных животных было выявлено уменьшение объемной плотности микропиноцитозных везикул: люминальных — на 73 %, цитоплазматических — на 74 %, базальных — на 71 %, концентрация крист митохондрий была увеличена на 10 %, численная плотность прикрепленных рибосом — на 69 %, а объемная плотность мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума — на 89 % (см. рис. 2). По сравнению с соответствующими показателями эндотелиоцитов кровеносных капилляров через 3 и 7 суток развития опухолевого процесса отмечали достоверное увели-



а



б

Рис. 3. Нарушение контактов между соседними эндотелиальными клетками кровеносных капилляров карциносаркомы Walker 256 через 7 (а) и нарушение структуры митохондрий через 14 суток после гипертермии (б) Увеличение $\times 6000$

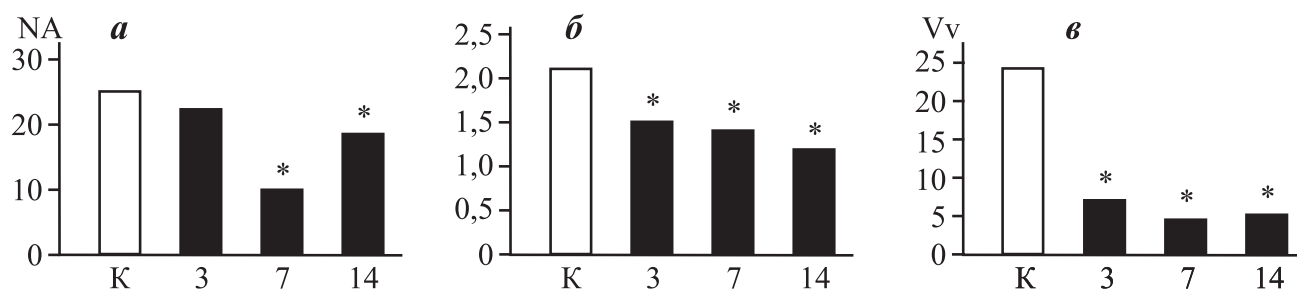


Рис. 4. Содержание органелл в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров в динамике развития карциномы Walker 256 в условиях общей гипертермии

чение численной плотности прикрепленных и свободных полисомальных рибосом (см. **рис. 2, а**).

Через 3 суток после гипертермии в структуре кровеносных капилляров наблюдали более плотные контакты эндотелиоцитов за счет слияния мембран соседних клеток по сравнению с капиллярами при спонтанном развитии опухоли. В то же время преобладающими были микрососуды с неплотными контактами эндотелиоцитов (см. **рис. 1**). В цитоплазме эндотелиоцитов была снижена на 52 % объемная плотность митохондрий. Уменьшались объемные плотности микропиноцитозных везикул (люминальных и цитоплазматических — на 70 %, базальных — на 50 %), а также концентрация крист митохондрий (на 29 %). Численные плотности митохондрий, свободных и прикрепленных рибосом достоверно не отличались от соответствующих величин в контроле, но были снижены по сравнению с соответствующими величинами при спонтанном развитии опухоли (**рис. 3, 4**). Объемная плотность мембран гранулярного эндоплазматического ретикула была больше соответствующего значения в контроле на 35 %.

Через 7 и 14 суток общей гипертермии в структуре эндотелиоцитов развивались изменения, связанные с набуханием клеток, потерей связи эндотелиоцитов с базальной мембраной и разрыхлением межэндотелиальных контактов, уменьшением содержания цитоплазматических органелл. Наблюдали фрагменты эндотелиальных клеток в просвете капилляров и вакуолизацию эндотелиоцитов. Происходило нарушение контактов между соседними эндотелиальными клетками (см. **рис. 3**). При сравнении морфометрических показателей структуры эндотелиоцитов кровеносных капилляров W256 после общей гипертермии и эндотелиоцитов при спонтанном развитии опухолевого процесса было выявлено уменьшение объемной плотности митохондрий на 7-е сутки и в большей степени на 14-е сутки эксперимента (65 и 74 % соответственно). Объемная плотность микропиноцитозных везикул также уменьшилась, в большей степени на 14-е сутки после воздействия общей гипертермии: люминальных — на 48 и 57 %, цитоплазматических — на 40 и 30 %, базальных — на 28 и 46 % соответственно, концентрация крист митохондрий

была снижена в течение всего эксперимента, и в большей степени на 14-е сутки после воздействия общей гипертермии (на 46 %) по сравнению с величиной соответствующего показателя группы со спонтанным развитием опухоли. На протяжении всего эксперимента, и в большей степени на 14-е сутки после воздействия общей гипертермии, снижались численные плотности митохондрий, свободных и прикрепленных рибосом по сравнению с величинами соответствующих показателей в группах контроля и при спонтанном развитии опухоли (см. **рис. 2, 4**). Однако объемная плотность мембран гранулярного эндоплазматического ретикула на 7-е сутки эксперимента была меньше величины соответствующего показателя при спонтанном развитии опухолевого процесса на 54 %.

Закключение

При спонтанном развитии карциномы Walker 256 происходит ультраструктурная перестройка эндотелиоцитов кровеносных капилляров. Они имеют большую площадь мембран гранулярной эндоплазматической сети и рибосом, как прикрепленных, так и свободных, в митохондриях возрастает концентрация крист. В то же время сниженной является величина объемной плотности микропиноцитозных везикул. Общая гипертермия оказывает повреждающее действие на структуру эндотелиоцитов кровеносных капилляров опухоли: происходит набухание клеток, потеря связи эндотелиоцитов с базальной мембраной, нарушение контактов между соседними эндотелиальными клетками, уменьшение содержания цитоплазматических органелл, набухание митохондрий и мембран гранулярной эндоплазматической сети.

Список литературы

1. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality and promise // J. Clin. Invest. 2000. 105. 17–19.
2. Bergers G., Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch // Nat. Rev. Cancer. 2003. 3. 401–410.
3. Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis // Am. J. Pathol. 1995. 146. 1029–1039.

4. Бгатова Н.П., Мешалкин Ю.П., Изаак Т.И. и др. Микроциркуляторное русло экспериментальной лимфосаркомы и метастазирование опухолевых клеток при введении наночастиц // Бюл. СО РАМН. 2008. 5. 18–25.
Bgatova N.P., Meshalkin Yu.P., Izaak T.I. et al. Microvasculature of experimental lymphosarcoma and innidiation of tumour cages at introduction of nanoparticles // Bul. SO RAMN. 2008. 5. 18–25.
5. Жуков Н.В. Современное состояние антиангиогенной терапии. Целевая терапия без мишени? // Практическая онкология. 2007. 8 (3). 64–172.
Zhukov N.V. The Modern state of antiangiogenic therapy. Having a special purpose therapy without a target? // Prakticheskaya onkologiya. 2007. 8 (3). 64–172.
6. Dvorak H.F. Rous-Whipple Award Lecture. How Tumors Make Bad Blood Vessels and Stroma // American Journal of Pathology. 2003. 162 (6). 1747–1757.
7. Wildiers H., Guetens G., De Boeck G. et al. Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11 // Br. J. Cancer. 2003. 88. 1979–1986.
8. Хегай И.И., Попова Н.А., Иванова Л.Н. Влияние экспрессии гена вазопрессина на рост карциносаркомы Walker 256 у крыс // Генетика. 2000. 42 (7). 993–995.
Khegay I.I., Popova N.A., Ivanova L.N. Influence of expression of vasopressin gene on growth of carcinosarcoma Walker 256 in rats // Genetika. 2000. 42 (7). 993–995.
9. Пат. 2165105 РФ. Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных / Ефремов А.В., Пахомова Ю.В., Пахомов Е.А. и др.; опублик. 12.10.2001.
Patent 2165105 RF. Method of experimental design of general hyperthermia for small laboratory animals / Efremov A.V., Pakhomova Yu.V., Pakhomov E.A. et al.; published 12.10.2001.
10. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
Avtandilov G.G. Medical morphometry. M.: Meditsina, 1990. 384 p.
11. Weibel E.R. Stereological methods. Practical method for biological morphometry. London; New York; Toronto; Sidney; San Francisco: Acad. Press, 1979. 1. 47–50.

ULTRASTRUCTURAL REORGANIZATION OF ENDOTHELIOCYTES OF BLOOD CAPILLARIES OF WALKER 256 CARCINOSARCOMA IN THE CONDITIONS OF THE TUMOUR SPONTANEOUS GROWTH AND UNDER GENERAL HYPERTHERMIA

Elena Vladimirovna OVSYANKO¹, Natalja Petrovna BGATOVA²,
Yakhid Umerovna OVSYANKO¹, Gennady Mikhailovich VAKULIN¹

¹*Novosibirsk State Medical University of Roszdrav
630091, Novosibirsk, Krasnyi av., 52*

²*Institute of Clinical and Experimental Lymphology SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

The ultrastructural reorganizations of endotheliocytes of Walker 256 carcinosarcoma at spontaneous cancer development and under general hyperthermia has been considered. The male rats Wistar of 180–200 g weight have been used in the investigation. The suspension of cells transplanted Walker 256 carcinosarcoma was administered to rats' thigh muscle at a dose of 1×10^6 cells. The samples of tumor tissue for electron microscopic studies were taken on the 5th day after tumor cells transplantation. It has been revealed that the impact of general hyperthermia has a damaging effect on the structure of the endothelial cells of the tumor blood capillaries: the cells swelling occurs, the loss of connection with endothelial basement membrane, loosening of interendothelial contacts, the decrease in cytoplasmic organelles content, swelling of mitochondrias and membranes of granular endoplasmic reticulum.

Key words: Walker 256 carcinosarcoma, endothelial cells, general hyperthermia.

Ovsyanko E.V. — candidate of medical sciences, associated professor, e-mail: Vin_San92@mail.ru

Bgatova N.P. — doctor of biological sciences, professor, head of the laboratory of ultrastructural investigation, e-mail: n_bgatova@ngs.ru

Ovsyanko Ya.U. — candidate of medical sciences, e-mail: Vin_San92@mail.ru

Vakulin G.M. — candidate of medical sciences, researcher of the central research laboratory