

УДК 616.42:616-006.304:611.42:616-006.6-033.2

МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОЕ РУСЛО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛИМФОСАРКОМЫ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ВВЕДЕНИИ НАНОЧАСТИЦ

Наталия Петровна БГАТОВА¹, Юрий Петрович МЕШАЛКИН², Татьяна Ивановна ИЗААК³, Виктория Викторовна ШЕДИНА¹, Ксения Викторовна КОРОБЧЕВСКАЯ², Анастасия Алексеевна ПОЖИДАЕВА¹, Василий Иванович КАЛЕДИН⁴, Юрий Иванович БОРОДИН¹

¹ ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4

² ГУ НИИ физиологии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 4

³ ГОУ ВПО «Томский государственный университет»
634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

⁴ Институт цитологии и генетики СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

В статье рассматривается структурная реорганизация микрососудов мышечной ткани бедра и подвздошного лимфатического узла в условиях экспериментальной лимфосаркомы LS. Исследовано накопление наночастиц при их введении в область опухолевого роста в макрофагах, литоральных, дендритных клетках подвздошного лимфатического узла и в гепатоцитах. Выявлено большее содержание опухолевых клеток в печени при введении наночастиц в область опухолевого роста.

Ключевые слова: лимфосаркома, кровеносные и лимфатические микрососуды, наночастицы, регионарный лимфатический узел, печень, метастазирование.

Метастазирование клеток в регионарные лимфатические узлы представляет собой первый шаг распространения большинства опухолевых образований. В то же время механизмы метастаза опухоли в «сторожевой» лимфатический узел недостаточно изучены и понятны [1]. Известно, что сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) А играет принципиальную роль в прогрессии опухоли и ангиогенезе, однако его значение в связанных с опухолью лимфангиогенезе и метастазировании неясно [2, 3]. На модели трансгенных мышей с гиперэкспрессией VEGF-A было показано, что VEGF-A вызывает быстрое развитие рака кожи, лимфатических сосудов, метастазы в «сторожевой» лимфатический узел и отдаленные лимфатические узлы. Было обнаружено, что до развития метастазов VEGF-A индуцировал лимфангиогенез в «сторожевом» лимфатическом узле. Это дает основание предполагать, что первичные опухоли могут готовить будущий путь метаста-

зирования, продуцируя факторы лимфангиогенеза, которые обеспечивают эффективный транспорт опухолевых клеток к «сторожевому» лимфатическому узлу. Этот механизм стимулирования лимфангиогенеза в «сторожевом» лимфатическом узле, способствующий метастазированию опухоли, представляет собой терапевтическую мишень для предотвращения метастаза [1]. Слабо изученными являются механизмы, регулирующие клеточное узнавание и взаимодействие внутри лимфатических сосудов, включая сложные синусные структуры лимфатических узлов [3]. Полагают, что использование в качестве мишеней эндотелиоцитов лимфатических капилляров также может быть потенциальной терапевтической стратегией блокирования метастазирования [1].

Актуальным и перспективным является использование нанотехнологий в диагностике и лечении опухолевых заболеваний. Для доставки наночастиц к опухолевым клеткам разрабаты-

Бгатова Н.П. — д.б.н., профессор

Мешалкин Ю.П. — зав.лабораторией НИИ физиологии, д.ф.-м.н., профессор

Изаак Т.И. — канд.х.н., доцент

Шедина В.В. — младш.н.с.

Коробчевская К.В. — аспирант

Пожидаетева А.А. — младш.н.с.

Каледин В.И. — старш.н.с.

Бородин Ю.И. — советник при дирекции, д.м.н., профессор, академик РАМН

ваются новые таргетные технологии, которые позволяют целенаправленно транспортировать лекарственные препараты непосредственно к злокачественным клеткам [4]. В то же время имеются данные о том, что наночастицы, в частности нанокристаллы гидроксиапатита, обладают проангиогенными свойствами. При их использовании выявлены такие же процессы стимуляции функции эндотелиальных клеток и ангиогенеза, как под действием VEGF [5]. Наночастицы не являются биологически инертными [6]. Поэтому актуальными являются исследования механизмов накопления и миграции наночастиц, эффектов их биологического действия в зависимости от формы, размера, исходного материала и других физико-химических особенностей строения, а также от дозы, способа введения, концентрации в области органа-мишени и продолжительности воздействия [7].

Целью данной работы было выявление структурных перестроек кровеносных и лимфатических микрососудов мышечной ткани бедра при развитии экспериментальной лимфосаркомы LS, исследование путей миграции и накопления наночастиц при их введении в область опухолевого роста, а также характера метастазирования опухолевых клеток.

Материал и методы

В эксперименте использовали мышей самцов линии СВА весом 25–30 г, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Использована перевиваемая лимфосаркома LS мышей, индуцированная у самцов линии СВА нитрозометилмочевинной [8]. Опухоль поддерживалась на мышах линии СВА в асцитной форме. Для прививки использовали клетки асцитного варианта опухоли. Асцитную жидкость разводили физиологическим раствором (1:10) и инъектировали мышам в мышцы правого бедра по 0,1 мл.

Для приготовления композита с наночастицами 0,2 г 10 нм частиц SiO_2 (Aldrich) диспергировали в 150 мл воды при добавлении 5 мл 25%-раствора аммиака при перемешивании в течение 48 часов. Затем к раствору добавляли 0,1 г поли-N-винилпирролидона (Aldrich, ММ = 55000), выдерживали 24 часа при комнатной температуре, воду и аммиак отгоняли на ротаторном испарителе. К 0,2 г полученного композита добавляли 10 мл физиологического

раствора и вводили мышам в область опухоли на 10-й день после трансплантации опухолевых клеток по 100 мкл взвеси на животное.

Для светооптического и электронномикроскопического исследования материал опухолевой ткани, подвздошного лимфатического узла и печени брали на 20-й день после трансплантации опухолевых клеток. Для изучения биологических образцов в просвечивающем режиме электронного микроскопа их фиксировали в 1%-растворе OsO_4 на фосфатном буфере ($\text{pH}=7,4$), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Из полученных блоков готовили полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашивали толудиновым синим, 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-NOVA, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010.

Результаты исследования

На периферии опухолевого роста отмечали одиночные опухолевые клетки и их скопления, располагающиеся в широких межмышечных интерстициальных пространствах рядом с кровеносными и лимфатическими капиллярами (рис. 1а-г). Наблюдалось нарушение структуры предсуществующих сосудов — отделение перicyтов, истончение эндотелиальной выстилки и разрушение базальной мембраны (рис. 1а). Отмечали пролиферацию эндотелиальных клеток микрососудов (рис. 1б). Выявляли новообразованные сосуды, которые отличались высоким эндотелием и большей плотностью расположения (рис. 1г). По мере продвижения к центру опухоли наблюдали снижение размеров интерстициальных пространств, уменьшение содержания сосудов и возрастание количества опухолевых клеток (рис. 1д). Вероятно, в связи с нарушением трофики, в центральной части опухоли имели место зоны апоптоза и некроза опухолевых клеток (рис. 1е).

Вокруг кровеносных и лимфатических капилляров, расположенных на периферии опухоли, отмечали широкие перикапиллярные пространства (рис. 2а,б). Эндотелиоциты имели узкую вытянутую цитоплазму с большим содержанием микропиноцитозных везикул, умеренным количеством рибосом, мембран гранулярной эндоплазматической сети и других органелл. Эндотелиоциты кровеносных и лимфатических капилляров прицентральной части опухоли

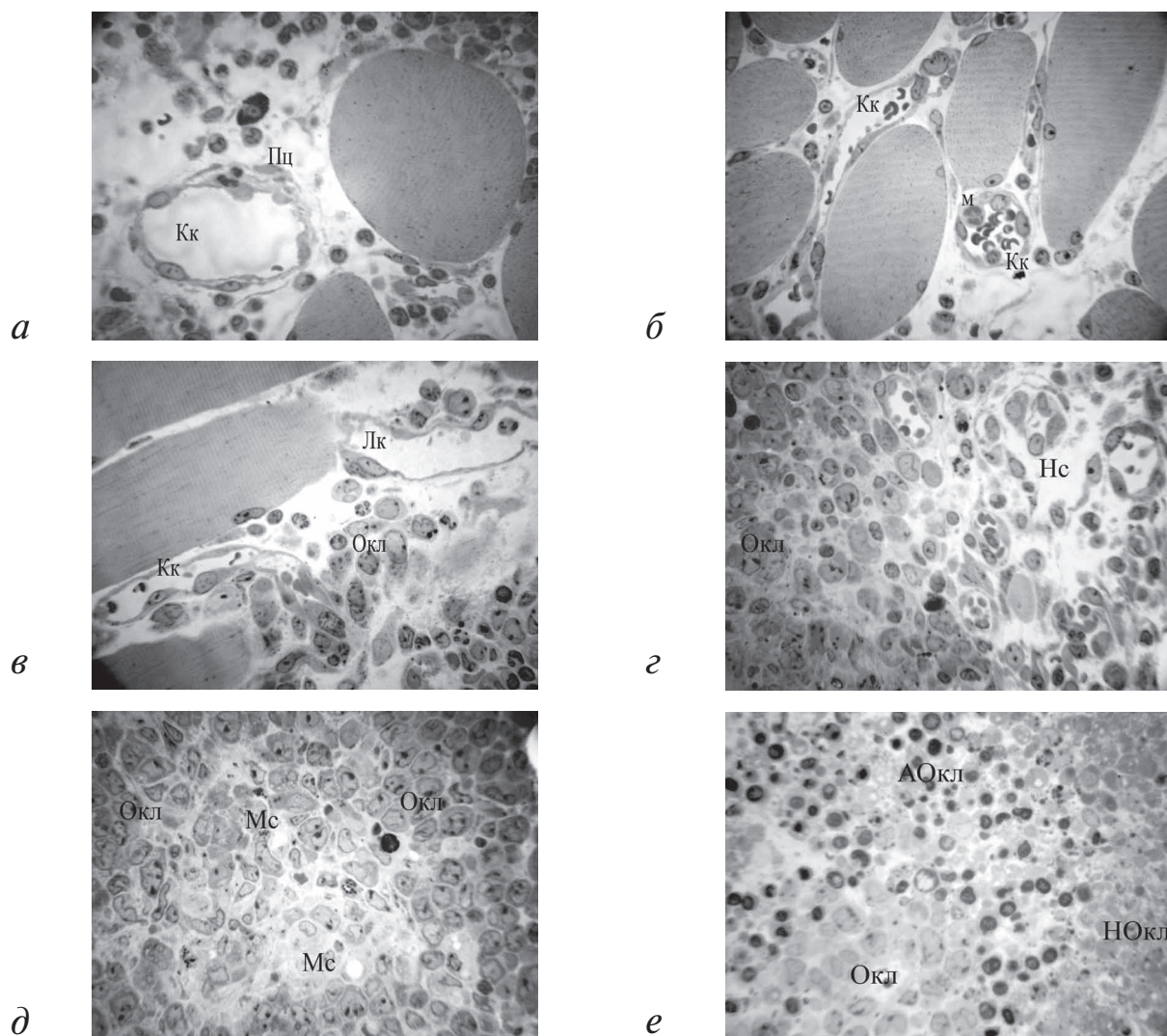


Рис. 1. Микроциркуляторное русло периферической и прицентральной области опухоли:
 а — широкие интерстициальные пространства и перестройка структуры кровеносного микрососуда периферической области опухоли;
 б — деление эндотелиальной клетки кровеносного микрососуда периферической области опухоли;
 в — кровеносный и лимфатический капилляры в периферической области опухоли;
 г — новообразованные сосуды в периферической области опухоли;
 д — плотное расположение опухолевых клеток и мелкие микрососуды в прицентральной области опухоли;
 е — апоптоз и некроз опухолевых клеток в центральной области опухоли.
 Кк — кровеносный капилляр, Кл — лимфатический капилляр, м — митоз, Пц — перicyт,
 Окл — опухолевые клетки, Мс — микрососуды, Нс — новообразованные сосуды, АОкл — апоптоз
 опухолевых клеток, НОкл — некроз опухолевых клеток.
 Окраска толуидиновым синим. Увеличение 10х40.

имели большую площадь мембран гранулярной эндоплазматической сети и рибосом, как прикрепленных, так и свободных (рис. 2в, 2г). В то же время сниженной была величина объемной плотности микропиноцитозных везикул (рис. 3, 4). Перикапиллярные пространства в данных участках опухоли не выявлялись в связи с плотным расположением опухолевых клеток вокруг сосудов (рис. 2).

В регионарных к опухоли подвздошных

лимфатических узлах отмечали наличие макрофагов, опухолевых клеток и лимфоцитов в просвете синусов, расширение лимфатических синусов, замещение лимфоидной паренхимы опухолевыми клетками. Литоральные клетки, выстилающие синусы лимфоузла, имели набухший вид. Часто наблюдали деструкцию их люминальной поверхности. При введении наночастиц в область опухолевого роста происходило накопление фагосом с наночастицами

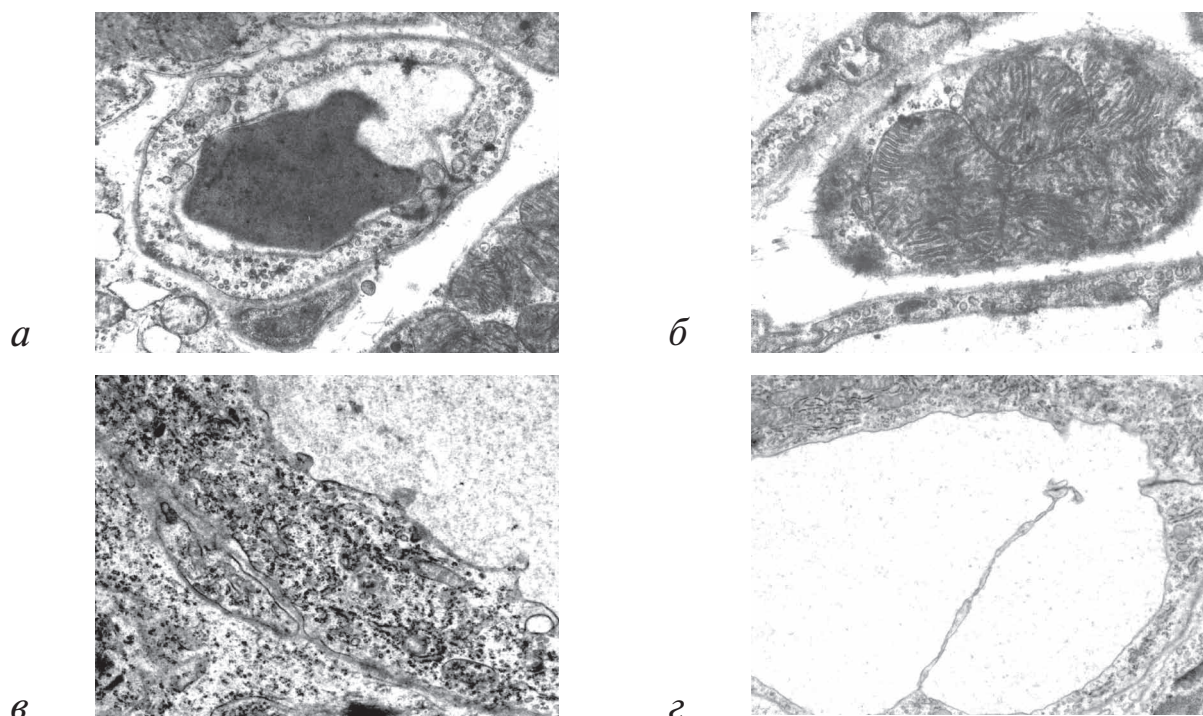


Рис. 2. Широкие перикапиллярные пространства и большое содержание микропиноцитозных везикул в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносного (а) и лимфатического (б) капилляров, расположенных на периферии опухоли. Возрастание содержания рибосом и мембран гранулярной эндоплазматической сети в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных (в) и лимфатических капилляров (г) центральной части опухоли. Увеличение $\times 8000$.

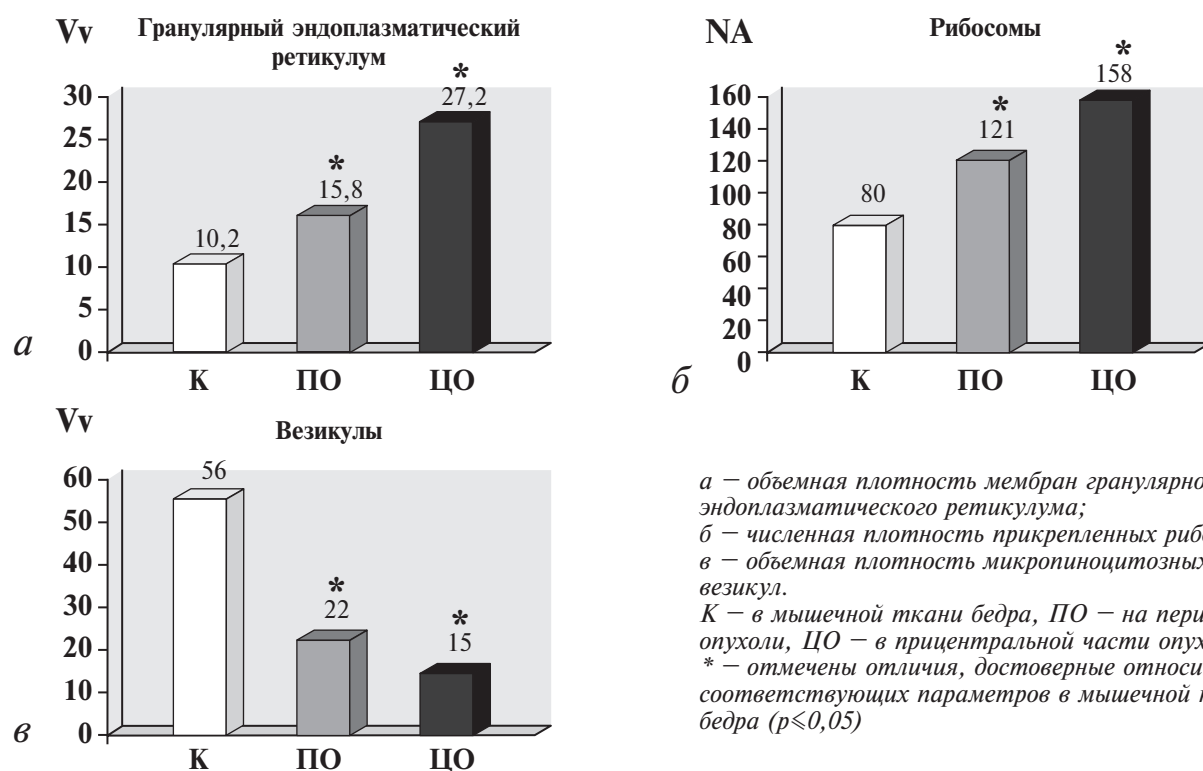
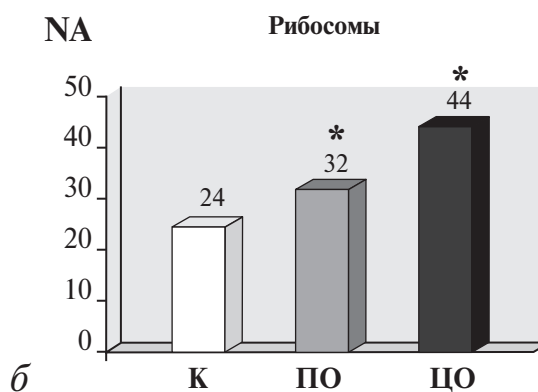
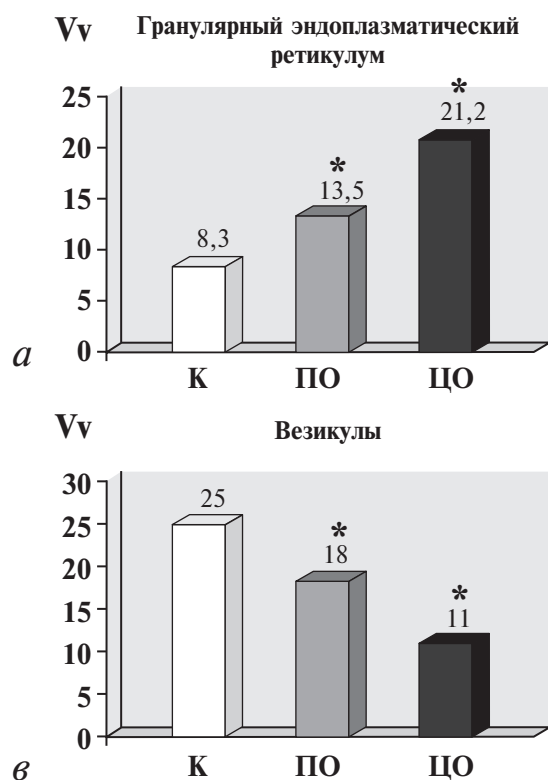


Рис.3. Содержание органелл в цитоплазме эндотелиоцитов кровеносных капилляров различной локализации в опухоли



а — объемная плотность мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума;
 б — численная плотность прикрепленных рибосом;
 в — объемная плотность микропиноцитозных везикул.
 К — в мышечной ткани бедра, ПО — на периферии опухоли, ЦО — в прицентральной части опухоли,
 * — отмечены отличия, достоверные относительно соответствующих параметров в мышечной ткани бедра ($p \leq 0,05$)

Рис. 4. Содержание органелл в цитоплазме эндотелиоцитов лимфатических капилляров различной локализации в опухоли

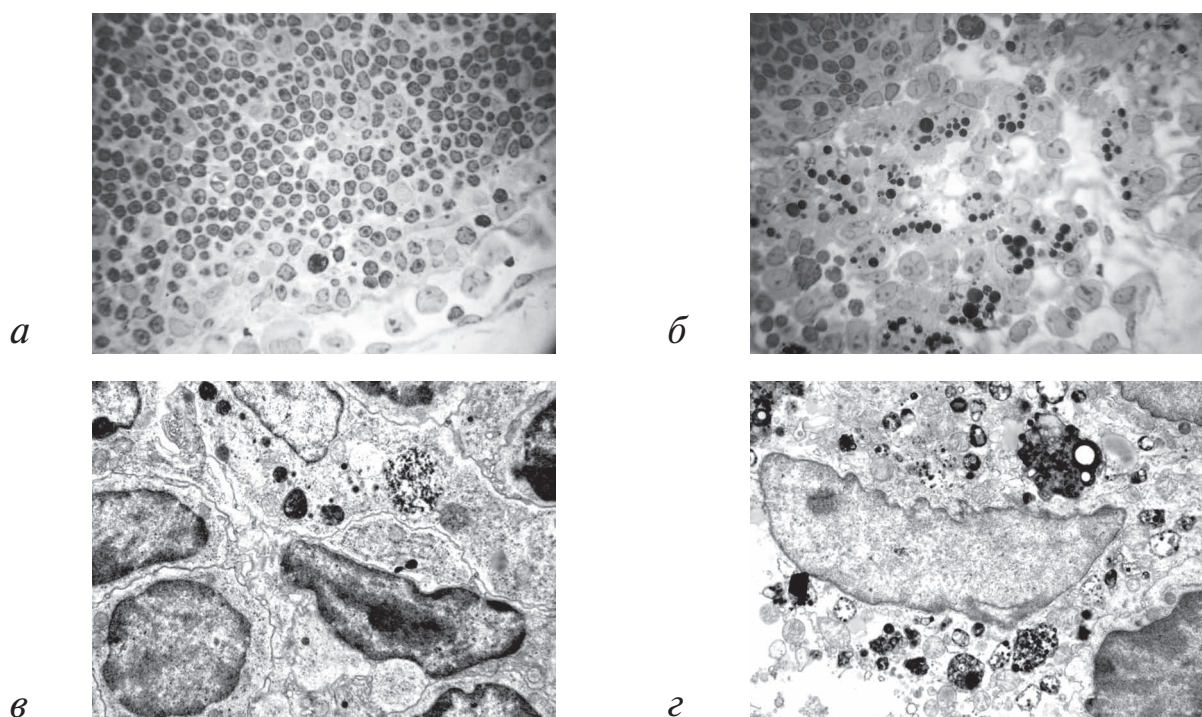


Рис. 5. Структура подвздошного лимфатического узла при экспериментальной лимфосаркоме: а — наличие опухолевых клеток в просвете подкапсульного синуса. Окраска толудиновым синим. Увеличение 10х25; б — опухолевые клетки и макрофаги с перегруженным вакуолярным аппаратом в подкапсульном синусе регионарного лимфатического узла при введении наночастиц в область опухолевого роста. Окраска толудиновым синим. Увеличение 10х40; в — накопление наночастиц в фагосомах дендритной клетки лимфоузла. Увеличение х10000; г — макрофаг с наночастицами в фагосомах. Увеличение х8000.

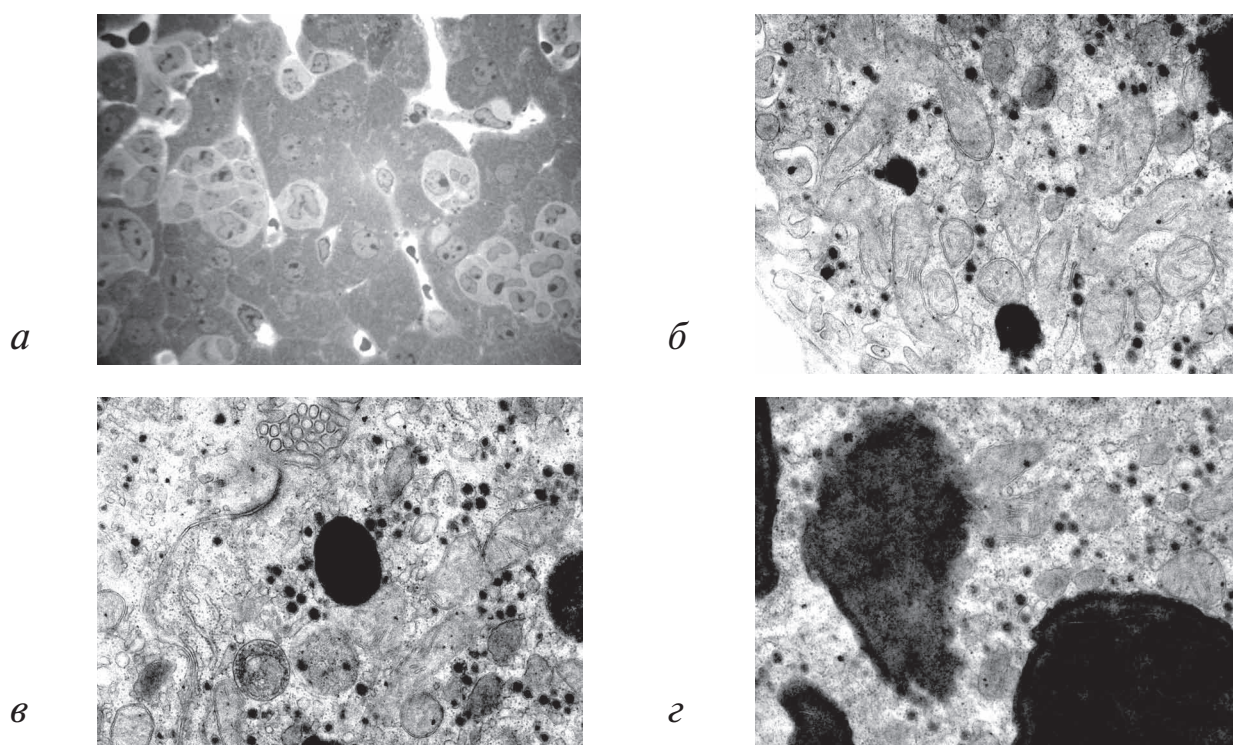


Рис. 6. Структура печени при введении наночастиц в область опухолевого роста экспериментальной лимфосаркомы бедра: а — одиночные опухолевые клетки и их скопления в пространстве Диссе и внутри паренхимы печени. Окраска толуидиновым синим, увеличение 10х40; б — накопление наночастиц в фагосомах гепатоцитов в области микроворсинок, граничащих с пространством Диссе, увеличение х10000; в — структурные признаки слияния отдельных мелких фагосом с наночастицами в более крупные, увеличение х10000; г — крупные фагосомы с наночастицами в цитоплазме гепатоцита, увеличение х10000.

в литоральных клетках подкапсульного синуса и дендритных клетках подвздошного лимфатического узла. Размеры фагосом варьировали от 0,3 до 1,2 мкм. В подкапсульном синусе отмечали накопление макрофагов с перегруженным вакуолярным аппаратом (рис. 5). Размеры фагосом с наночастицами варьировали от 0,39 до 3,43 мкм.

При исследовании структуры печени на 20 день после трансплантации опухолевых клеток в область бедра в просвете синусоидов отмечали одиночные опухолевые клетки, контактирующие с эндотелиальной выстилкой. Наблюдала гетерогенность в структуре гепатоцитов. Клетки различались по состоянию белок-синтетического аппарата и объему гликогена. В цитоплазме одних гепатоцитов наблюдали в 3 раза большую концентрацию мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума, при этом численная плотность прикрепленных рибосом увеличивалась в 3,5 раза. В среднем на 60% была снижена объемная плотность гликогена. Выявляли большое содержание вторичных лизосом. Митохондрии имели хорошо выражен-

ные кристы. Остальные гепатоциты имели признаки набухания цитоплазмы, содержали фрагментированные мембраны гранулярного эндоплазматического ретикулума и небольшое количество прикрепленных рибосом. Данные клетки отличались повышенным количеством везикул диаметром от 0,8-1 мкм.

В условиях введения в область опухолевого роста наночастиц наблюдали большее содержание опухолевых клеток в печени (рис. 6а). Опухолевые клетки и их скопления выявляли в синусоидах, пространстве Диссе и в паренхиме печени. В цитоплазме гепатоцитов происходило накопление наночастиц в фагосомах различного размера. В участках цитоплазмы гепатоцитов в области микроворсинок, граничащих с пространством Диссе, отмечали однородные по размерам фагосомы, составляющие $61,45 \pm 5,21$ нм (рис. 6б). Размеры фагосом с наночастицами возрастали от периферии к центру клетки. Имели место структурные признаки слияния отдельных мелких фагосом в более крупные, достигающие 500-1000 нм (рис. 6г).

Обсуждение

Известно, что опухоль может метастазировать через кровеносные, лимфатические сосуды и интерстиций. В настоящее время обсуждаются вопросы преимущественного транспорта опухолевых клеток через внутри- или околоопухолевые сосуды. Детальный анализ лимфатических структур из сквамозной карциномы головы и шеи человека показывает, что внутриопухолевые лимфатические сосуды играют существенную роль в предопределении появления рецидивов, тяжести болезни и чувствительности к терапии. По мнению авторов [3], присутствие внутриопухолевых лимфатических сосудов создаёт прямую дорогу опухолевым клеткам для достижения удаленных мест. В то же время на экспериментальных мышинных моделях найдено, что опухоли содержат повышенные уровни VEGF-C, обладают высокой метастатической способностью, но не метастазируют посредством внутриопухолевых лимфатических сосудов из-за высокого давления, обнаруживаемого внутри опухоли. Наличие околоопухолевых лимфатических сосудов эффективно может служить для транспорта опухолевых клеток. Они менее подвержены стрессам, сдавливанию и обеспечивают больший объём тока [9].

Полученные нами морфологические данные о строении кровеносных и лимфатических капилляров периферической и прицентральной части экспериментальной лимфосаркомы LS свидетельствуют о большей вероятности метастазирования данного вида опухоли через сосуды периферической части, чем через сосуды центральной части. Об этом косвенно свидетельствуют плотные контакты эндотелиальных клеток сосудов прицентральной части опухоли, возрастание количества органелл белкового синтеза и слабое развитие в цитоплазме эндотелиоцитов везикулярного аппарата (имеются данные о трансэндотелиальном переносе опухолевых клеток через везикулярные каналы [10]), отсутствие перикапиллярных пространств в связи с плотным окружением микрососудов опухолевыми клетками.

Наблюдаемые нами структурные перестройки синусной системы в регионарном к опухоли подвздошном лимфатическом узле были описаны для лимфатических узлов другой локализации. Так, например, Харрел и соавторы [11] при развитии меланомы отмечали расширение синусов в регионарном лимфатическом узле, развитие лимфатических сосудов и заселение его опухолевыми клетками. Было пока-

зано значительное увеличение транзита наночастиц через лимфоузел. Авторы полагают, что лимфангиогенез и усиление тока лимфы через дренирующий опухоль регионарный лимфатический узел может усилить метастазирование по лимфатическим сосудам [11].

В последнее время возросла актуальность использования нанотехнологий в диагностике и лечении опухолевых заболеваний. Применение наночастиц перспективно для обеспечения визуализации специфических мишеней при проведении магнитно-резонансной томографии, гамма-томографии и ультразвуковой диагностики. Исследователи считают, что новая технология повысит эффективность мониторинга и лечения опухолей. Она позволит корректировать продолжительность лечения, дозы препаратов или даже выбор терапевтического протокола. Однако появляются данные о том, что наночастицы могут воздействовать на живые клетки и с нежелательным эффектом. Так, например, показано накопление наночастиц на поверхности фибробластов и в фаголизосомах внутри клетки [12]. Поэтому существует потребность в осторожном рассмотрении преимуществ и побочных эффектов использования наночастиц в медицине [7].

Полученные нами данные по введению наночастиц SiO₂ в область опухолевого роста свидетельствуют об их накоплении в фагосомах макрофагов, литоральных, дендритных клеток регионарного к опухоли лимфатического узла и в гепатоцитах. При этом в условиях введения в область опухолевого роста данных наноструктур более выражены метастазы в печени. Обладают ли использованные нами наночастицы «проангиогенными свойствами», как это было описано для нанокристаллов гидроксиапатита [5], требует дальнейшего исследования.

Заключение

При развитии экспериментальной лимфосаркомы LS происходит деструкция существующих кровеносных и лимфатических капилляров и образование новых микрососудов, отличающихся высоким эндотелием, большим содержанием органелл белкового синтеза и низкой концентрацией транспортных везикул. Возрастает плотность расположения микрососудов. При введении в область опухолевого роста наночастиц SiO₂, они накапливаются в макрофагах, литоральных, дендритных клетках регионарного к опухоли подвздошного лимфатического узла и в гепатоцитах. В условиях введения наночастиц в большей степени выявляются метастазы в печени.

Литература

1. Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis // *Nat Rev Cancer*. 2005. Vol. 5, № 9. 735-743.
2. Mylona E., Alexandrou P., Mpakali A. et al. Clinicopathological and prognostic significance of vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and -D and VEGF receptor 3 in invasive breast Carcinoma // *European Journal of Surgical Oncology*. 2007. Vol. 33, №3. 294-300.
3. Warburton G., Nikitakis N.G., Roberson P. et al. Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma // *J. Oral Maxillofac. Surg*. 2007. 65. 3. 475-484.
4. Klivanov A., Hughes M., Marsh J. et al. Targeting of ultrasound contrast material: an in vitro feasibility study // *Acta Radiol*. 1997. Vol. 412. 113-120.
5. Pezzatini S., Morbidelli L., Solito R. et al. Nanostructured HA crystals up-regulate FGF-2 expression and activity in microvascular endothelium promoting angiogenesis // *Bone*. 2007. Vol. 41, № 4. 523-534.
6. Medina C., Santos-Martinez M.J., Radomski A. et al. Radomski Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance // *Br J Pharmacol*. 2007. Vol. 150, № 5. 552-558.
7. Дурнев А. Д. Токсикология наночастиц // *Бюлл. Эксперим. биол. Мед*. 2008. 145, 1. 78-80.
8. Дурнев А.Д. Toxicology of nanoparticles // *Byull. Eksperim. biol. Med*. 2008. 145, 1. 78-80.
9. Каледин В.И., Николин В.П., Агеева Т.А и др. Циклофосфан-индуцированный апоптоз клеток мышиной лимфосаркомы в условиях in vivo // *Вопросы онкологии*. 2000. 46, 5. 588-593.
10. Каледин В.И., Николин В.П., Агеева Т.А. Cyclophosphan-induced apoptosis of the cells of mice lymphosarcoma in vivo // *Voprosy onkologii*. 2000. 46, 5. 588-593.
11. Clauss, M. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration // *J Exp Med*. 1990. 172, 6. 1535-1545.
12. Azzali G. Tumor Cell Transendothelial Passage in the Absorbing Lymphatic Vessel of Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate // *American Society for Investigative Pathology*. 2007. 170. 334-346.
13. Harrel M.I., Harrel B.M., Iritani A. Ruddell Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis // *Am. J. Pathol*. 2007. 170, 774-786.
14. Curtis A. Biomedical aspects of magnetic nanoparticles // *Europhysics News*. 2003. 34, 6.

MICROCIRCULATORY CHANNEL OF EXPERIMENTAL LYMPHOSARCOMA AND TUMORS METASTASIZE AFTER NANOPARTICLES INJECTION

Natalia Petrovna BGATOVA¹, Yury Petrovich MESHALKIN², Tatyana Ivanovna IZAAK³, Victoria Viktorovna SHEDINA¹, Ksenia Viktorovna KOROBCEVSKAJA², Anastasia Alekseevna POZHIDAIEVA¹, Vasily Ivanovich KALEDIN⁴, Yury Ivanovich BORODIN¹

¹ SI Institute of Clinical and Experimental Lymphology, SB RAMS,
4, Ac. Timakov str., Novosibirsk, 630117

² SI Institute of Physiology SB RAMS,
4, Ac. Timakov str., Novosibirsk, 630117

³ Tomsk State University,
36, Lenin's prospect, Tomsk, 634050

⁴ Institute of Cytology and Genetics SB RAS
10, Lavrent'ev prospect, Novosibirsk, 630090

Structural reorganization of microvessels of a muscular tissue of a leg and inguinal lymph node in conditions of experimental lymphosarcoma LS are considered. Accumulation nanoparticles in macrophages, litoral cells of the inguinal lymph node and hepatocytes after their introduction in tumors growth area are investigated. The features of tumors metastasize to sentinel lymph nodes and liver after nanoparticles injection are studied

Key word: lymphosarcoma, blood and lymphatic microvessels, nanoparticles, regional lymph node, liver, metastasize.

Bgatova N.P. — Head laboratory, professor, e-mail: n_bgatova@ngs.ru

Meshalkin Yu.P. — Head laboratory of laser biophysics, professor

Isaak T.I. — ass. professor, PhD

Shedina V.V. — junior research of the laboratory ultrastructural investigation

Korobchevskaya K.V. — post graduent student

Pozhidaeva A.A. — junior research of the laboratory ultrastructural investigation

Kaledin V.I. — seniour scientific, PhD

Borodin Yu.I. — councilor at administration, professor, academician RAMS