

*Е.В. Овсянко, М.Г. Пустоветова, Е.Н. Самсонова, Я.У. Овсянко, Р.Г. Федина,
А.О. Кулишенко, А.С. Виноградов*

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КРОВЕНОСНЫХ КАПИЛЛЯРОВ КАРЦИНОСАРКОМЫ WALKER 256 ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МЕЛАТОНИНА

Новосибирский государственный медицинский университет

У крыс линии Wistar с перевиваемой карциносаркомой Walker 256 применение мелатонина в качестве моноагента вызывает изменения внутриклеточной организации эндотелиоцитов: снижение объемной плотности митохондрий, гранулярной цитоплазматической сети, микропиноцитозных везикул, уменьшение численной плотности свободных и прикрепленных рибосом, что в свою очередь приводит к усилению апоптоза опухолевых клеток карциносаркомы Walker 256.

Ключевые слова: карциносаркома Walker 256, эндотелий кровеносных капилляров, мелатонин, электронная микроскопия

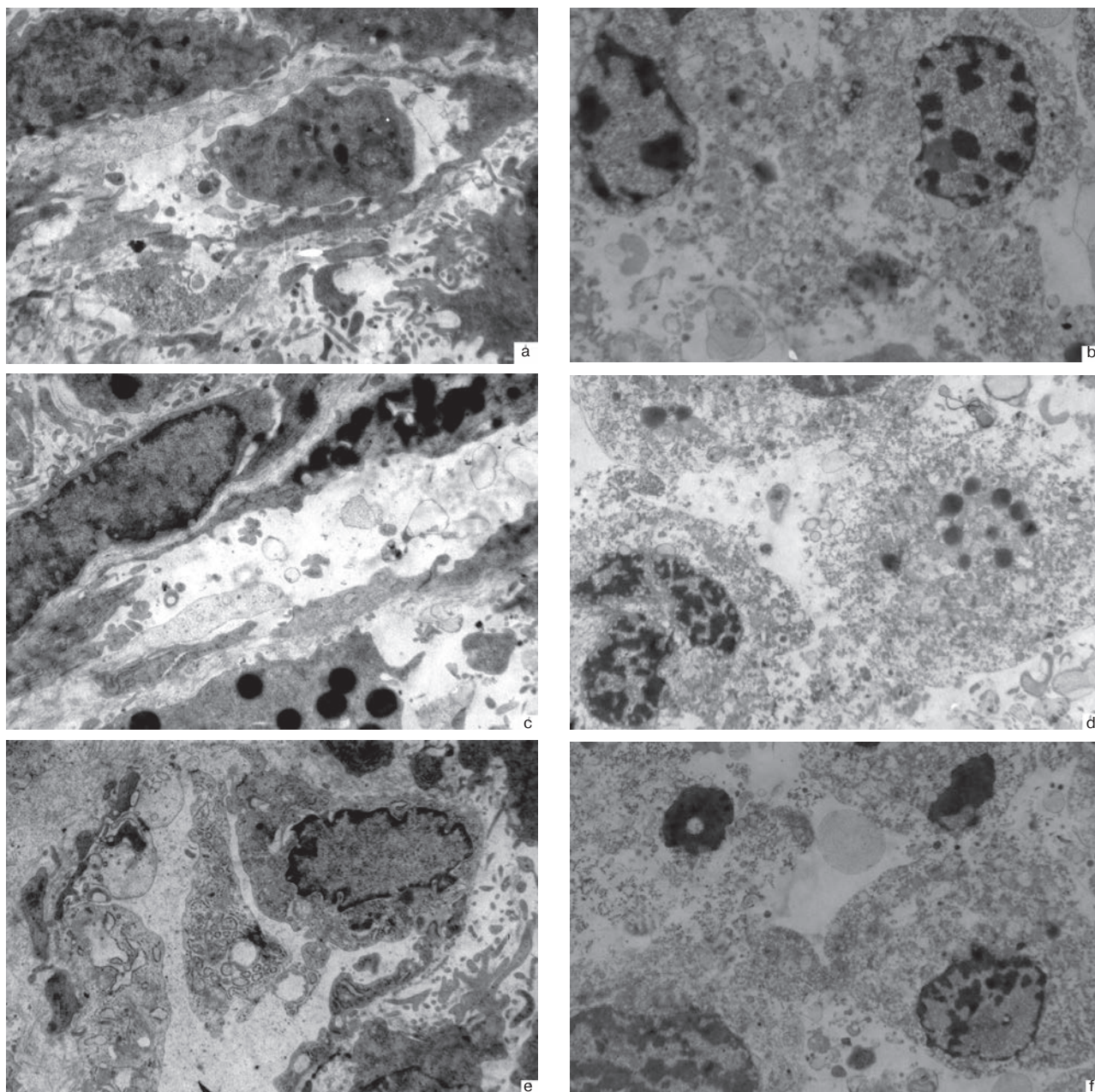
В последние десятилетия значительным достижением в области разработки новых эффективных методов терапии злокачественных новообразований явилось создание концепции противоопухолевой терапии, основанной на подавлении ангиогенеза [12]. В настоящее время известно, что важнейшим этапом развития опухоли является ее способность индуцировать и поддерживать ангиогенез. Показано, что в опухоли образуется сосудистая сеть, которая значительно отличается от сосудов здоровой ткани [9,11]. Кровеносные капилляры опухоли 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. Поэтому в качестве перспективной мишени подавления злокачественного роста определен опухолевый ангиогенез. В то же время недостаточно данных об ультраструктурных перестройках эндотелиоцитов кровеносных капилляров в условиях терапевтического воздействия, что имеет важное значение для определения эффективности лекарственной терапии [1,13]. В связи с этим актуальным является поиск способов блокирования развития новых кровеносных сосудов опухоли, являющимся одним из подходов к подавлению процессов метастази-

рования. Несмотря на исследования ингибирующего действия мелатонина на рост опухолей [8], его влияния на ангиогенез в опухолевой ткани остаются не ясными.

Целью настоящей работы – изучение ультраструктурной реорганизации эндотелиоцитов кровеносных капилляров (ЭКК) карциносаркомы Walker 256 (W256) при воздействии мелатонином (MT).

Материалы и методика

Использовали крыс самцов линии Wistar с массой тела 180–200 г. Работу с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией и директивами по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте [6,10]. Использовали перевиваемый штамм опухоли W256, поддерживаемый *in vivo* (Лаборатория физиологической генетики Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). Суспензию клеток перевиваемой W256 вводили животным мышцу бедра в дозе 1×10^6 клеток в 0,1 мл изотонического раствора NaCl [7]. Через 5 сут. с момента перевивки опухоли, когда ее объем достигал $2,51 \pm 0,42$ см³, животных разделяли на две группы: 1-я группа (n = 21) – контроль со «спонтанным» развитием опухоли; 2-я группа (n = 21) – животные с W256 при воздействии MT (ICN Biomedicals Inc. USA). MT вводился в дозе 0,3 мг/кг внутрибрюшинно в течение 3-х, 7-и и 14-и сут., спустя 5-ть сут., с момента перевивки W256. Животных содержали при фиксированном световом режиме (свет – темнота 12:12 с включением освещения в 8.00 и выключением в 20.00). Опухолевую ткань для электронномикроскопического исследования забирали в следующие сроки: у животных 1-й группы – на 5-е, 12-е и 19-е сут., с момента перевивки W256; у крыс 2-й группы – на 3-е, 7-е и 14-е сут., с момента введения MT. Образцы опухоли по 5 кусочков от каждого животного, величиной 1 мм³ фиксировали в 4% параформальдегидном фиксаторе на 0,1M фосфатном буфере Миллони (pH=7,4) при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем после промывки в охлажденном буфере Миллони образцы в течение 1 ч. дополнительно фиксировались на холоде в 1% осмиевом фиксаторе на 0,2 M каодилатном буфере (pH=7,4) с добавлением 1,5% ферроцианида калия. После дегидратации в серии спиртов возрастающей концентрации образцы заключали в эпоновую смолу. 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-8800, контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1010. Морфометрию



Эндотелиоциты кровеносных капилляров (ЭКК) и опухолевые клетки (ОК) карциносаркомы Walker 256 (W256) после введения мелатонина: а - ЭКК W256 через 3 сут. Набухание цитоплазмы одного эндотелиоцита и повышение электронной плотности – другого. Неплотные контакты между эндотелиальными клетками; б - апоптоз ОК W256 через 3 сут; с - ЭКК W256 через 7 сут. Набухание цитоплазмы одного эндотелиоцита и возрастание плотности – в другом; неплотные контакты между клетками; д - апоптоз ОК W256 через 7 сут; е - ЭКК W256 через 14 сут. Гетерогенность эндотелиоцитов. Набухание и повышение электронной плотности эндотелиальных клеток. ОК в стенке капилляра. Неплотные контакты между эндотелиальными клетками; ф - апоптоз ОК W256 через 14 сут. а, б, с, д, е, ф - $\times 8000$.

эндотелиальных клеток (по 50 клеток на каждую группу) проводили при конечном увеличении в 32000 раз с помощью закрытой тестовой системы с 144 точками. Полученные в экспериментах цифровые данные обрабатывали с использованием общепринятых методов статистики [2], уровень значимости отличий оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

По данным нашего исследования, на протяжении всего срока эксперимента после введения МТ в W256 наблюдали ЭКК с гетерогенными эндотелиоцитами. В одних клетках происходило

набухание цитоплазмы, в других – повышалась электронная плотность. Контакты между ЭКК были неплотными (рис. 1а; 1с; 1е). Увеличивалось количество опухолевых клеток с ультраструктурными признаками развивающейся дистрофии, некроза и апоптоза (рис. 1б; 1д; 1ф).

Имели место необратимые некротические изменения структуры опухолевых клеток. Ранее нами было продемонстрировано значительное снижение уровня экспрессии Bcl-2 и возрастание величины показателей проапоптогенных белков Bax и Bad при воздействии МТ на перевивную W256 [5]. По-видимому, здесь проявляется он-

Морфометрический анализ эндотелиоцитов кровеносных капилляров карциносаркомы Walker 256 после введения мелатонина (M±m)

Исследованные параметры	Контроль	5 сут с момента трансплантации	3 сут после воздействия мелатонина	12 сут с момента трансплантации	7 сут после введения мелатонина	19 сут после трансплантации	14 сут после введения мелатонина
Митохондрии (Vv)	8,4±0,15	7,8±0,12	4,8±0,27*	8,2±0,17	5,0±0,68*	8,5±0,32	4,7±0,12*
Митохондрии Sv внутр. мембрана Sv наружн. мембрана	2,1±0,12	2,6±0,14*	1,4±0,18*	2,5±0,24*	1,2±0,35*	2,3±0,15*	1,1±0,26*
Митохондрии (NA)	4,6±0,32	4,2±0,25	3,0±0,54*	4,0±0,16	3,2±0,18*	4,1±0,28	3,0±0,42*
ГЭР (Vv)	10,2±0,14	18,3±0,19*	6,7±0,15*	16,9±0,53*	7,0±0,12*	19,3±0,45*	23,8±0,17*
Рибосомы прикрепленные (NA)	25,1±1,28	38,6±1,22*	12,8±3,21*	36,1±1,48*	14,6±3,52*	42,5±1,67*	12,5±3,68*
Рибосомы свободные полисомальные (NA)	28,4±1,13	32,1±1,18*	15,3±2,36*	29,7±1,32*	12,5±2,77*	35,4±1,76*	10,2±2,19*
Лизосомы (Vv)	2,1±0,22	2,2±0,15	2,0±0,42	2,3±0,19	1,8±0,15	2,2±0,12	1,9±0,34
Лизосомы (NA)	2,0±0,17	2,2±0,36	2,1±0,19	2,1±0,25	2,2±0,48	2,3±0,34	2,1±0,23
Люминальные МПВ (Vv)	21,6±0,42	7,1±0,27*	3,8±0,12*	6,9±0,36*	4,0±0,11*	6,2±0,11*	3,7±0,45*
Цитоплазматические МПВ (Vv)	24,3±0,55	7,4±0,39*	3,2±0,63*	7,0±0,44*	3,6±0,25*	6,5±0,27*	3,2±0,18*
Базальные МПВ (Vv)	18,1±0,34	8,9±0,16*	4,6±0,18*	8,5±0,12*	4,2±0,15*	5,3±0,14*	3,5±0,29*

Примечание: Vv – объемная плотность (%); NA – численная плотность (число в тестовой площади); Sv – поверхностная плотность (мкм²/мкм³) * – достоверное отличие от соответствующих показателей у крыс со «спонтанным» развитием опухолевого процесса соответствующего срока.

костатическое действие МТ, выражающиеся в снижении пролиферативной активности клеток, увеличение числа клеток, гибнущих в результате апоптоза [4].

При сравнении морфометрических показателей структуры ЭКК W256 на протяжении всего срока эксперимента после введения МТ и при «спонтанном» развитии опухолевого процесса было выявлено снижение объемной плотности митохондрий на 38%, 39% на 45% соответственно (табл.). В связи с набуханием органелл концентрация крист митохондрий снизилась на 46%, 52%, 52% по сравнению с контролем (табл.). Объемная плотность микропиноцитозных везикул уменьшилась: люминальных – на 46 %, 42%, 40%, цитоплазматических – на 57%, 49%, 51%, базальных – на 48%, 51%, 34 % (табл.). Достоверно снижались численные плотности митохондрий, свободных и прикрепленных рибосом, по сравнению с соответствующими величинами в контроле и с соответствующими величинами при спонтанном развитии опухоли (табл.). Объемная плотность гранулярной цитоплазматической сети была меньше соответствующего значения при «спонтанном» развитии опухолевого процесса на 63%, 59% и 23% соответственно (табл.). Численные плотности прикрепленных и свободных (полисомальных) рибосом снижались на 67 и 52%, 60 и 58%, 70 и 71%, соответственно (табл.).

Таким образом, включение МТ в схемы противоопухолевой терапии обусловлено не только

его антиоксидантной активностью [3] и способностью ингибировать «спонтанный» опухолевый рост [4, 5]. Кроме того, проведенное нами исследование позволяет полагать, что МТ является индуктором морфогенетических процессов, способствуя изменению архитектоники ЭКК опухоли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бгатов Н.П., Мешалкин Ю.П., Изаак Т.И. и др. Микроциркуляторное русло экспериментальной лимфосаркомы и метастазирование опухолевых клеток при введении наночастиц // Бюлл. СО РАМН. – 2008. – № 5. – С. 18-25.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М. - 1999.
3. Ефремов А.В., Овсянко Е.В., Сафронов И.Д. и др. Изменение содержания жирорастворимых антиоксидантов у животных с карциносаркомой WALKER-256 под влиянием различных видов терапии // Патол. физиол. – 2009. - № 3. – С. 27-29.
4. Лушникова Е.Л., Овсянко Е.В., Непомнящих Л.М. и др. Пролиферация клеток карциносаркомы Walker 256: влияние общей гипертермии и противоопухолевых агентов // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 3. – С. 159-166.
5. Овсянко Е.В., Ефремов А.В., Лушникова Е.Л. и др. Иммуногистохимический анализ программируемой гибели клеток карциносаркомы Walker 256 при воздействии цитостатическими препаратами // Бюлл. эксперим. биол. – 2009. –Т. 149. - № 10. – С. 455-460.
6. Руководящие принципы ухода за животными и их использования в эксперименте // Журн. высш. нервн. деят. – 1990. – № 1. – С. 203.
7. Хегай И. И., Попова Н. А., Ганилова Л. С. и др. Динамика опухолевого роста у крыс линии Brattleboro и

Wag при введении разных доз карциносаркомы Walker 256 // Бюл. эксп. биол. – 2008. – Т. 145. – № 1. – С. 88-90.

8. Bartsch C., Kvetnoy I.M., Kvetnaia T.V. et al. Nocturnal urinary 6-sulfatoxymelatonin and proliferating cell nuclear antigen-immunopositive tumor cells show strong positive correlations in patients with gastrointestinal and lung cancer // J. Pineal Res. – 1997. – Vol. 23. – P. 90-96.
9. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch // Nat. Rev. Cancer. – 2003. – Vol. 3. – P. 401-410.
10. Council Directive of 24 November 1986 on the Approximation of Laws, Regulations of the Member States Regarding the Protection of Animals Used for Experimental and Other Purposes Directive (86/609/EEC) // Official Journal of the European Communities L 262. – P. 1-29.
11. Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M., Dvorak A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis // Amer. J. Path. – 1995. – Vol. 146. – P. 1029-1039.
12. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality and promise // J. Clin. Invest. – 2000. – Vol. 105. – P. 17-19.
13. Wildiers H., Guetens G., De Boeck G. et al. Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11 // Br. Cancer. – 2003. – Vol. 88. – P. 1979-1986.

*E.V. Ovsyanko, M.G. Pustovetova, E.N. Samsonova,
Ya.U. Ovsyanko, R.G. Fedina, A.O. Kulishenko,
A.S. Vinogradov*

Ultrastructural changes in endothelial cells of blood capillaries of the Walker 256 carcinosarcoma in the application of melatonin

State Medical University, Novosibirsk

In Wistar rats with transplanted Walker 256 carcinosarcoma a use of melatonin as monoagent causes changes in intracellular organization of endothelial cells: reduced volume density of mitochondria, granular cytoplasmic network, micropinocytic vesicles, reduced the number density of free and attached ribosomes, which leads to increased apoptosis of tumor cells of Walker 256 carcinosarcoma.

Key words: Walker 256 carcinosarcoma, endothelial cells of blood capillaries, melatonin, electron microscopy

Поступила в редакцию 11.10.2013 г.