

Т. А. Куниц, А. В. Ефремов, Е. В. Овсянко, М. Г. Пустоветова

**ОЦЕНКА МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ  
КРЫС WISTAR В УСЛОВИЯХ СПОНТАННОГО РАЗВИТИЯ  
КАРЦИНОСАРКОМЫ WALKER 256**

ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Проведено микро- и ультраструктурное исследование печени крыс Wistar в динамике развития перевивной карциносаркомы Walker 256. Выявлены закономерности прогрессирования опухолевого процесса в виде метастатического поражения печени с образованием внутريدольковых метастазов. Ультраструктурно обнаружены коротко-дистантные взаимодействия клеток карциносаркомы с гепатоцитами, дезинтегративного характера подчеркивающие нарушения ультраструктуры гепатоцитов, прилежащих к метастатическим клеткам. На ранних стадиях развития опухоли отмечена активация цитотоксической функции печени с некрозом опухолевых очагов, сопровождающаяся снижением структурной плотности метастазов. На продвинутых стадиях развития карциносаркомы Walker 256 оценка параметров инвазии опухоли в печени показала интенсификацию процессов метастазирования с усилением выраженности воспалительных реакций.

**Ключевые слова:** печень, карциносаркома Walker 256, метастазы, ультраструктура

Печень является органом, наиболее часто поражаемым метастатическими опухолями [5], поскольку служит своеобразным фильтром, «санитарным постом» на пути распространения опухолевых клеток по воротной вене. Метастатические опухоли составляют от 70 до 95% среди всех форм злокачественных новообразований печени. Образование метастазов инициируется попаданием циркулирующих опухолевых клеток в ткань печени как через артериальную кровь, так и непосредственно из соседних висцеральных органов. Проникновение клеток опухоли запускает каскад реакций с высвобождением провоспалительных цитокинов, хемокинов, проангиогенных факторов и протеиназ, причем выраженность такого ответа зависит от конкретного типа опухоли и набора продуцируемых ею факторов [4]. По мере роста вторичной опухоли возникает необходимость в ангиогенезе для поддержания ее роста, в основе которого лежит пролиферация эндотелиальных клеток [6].

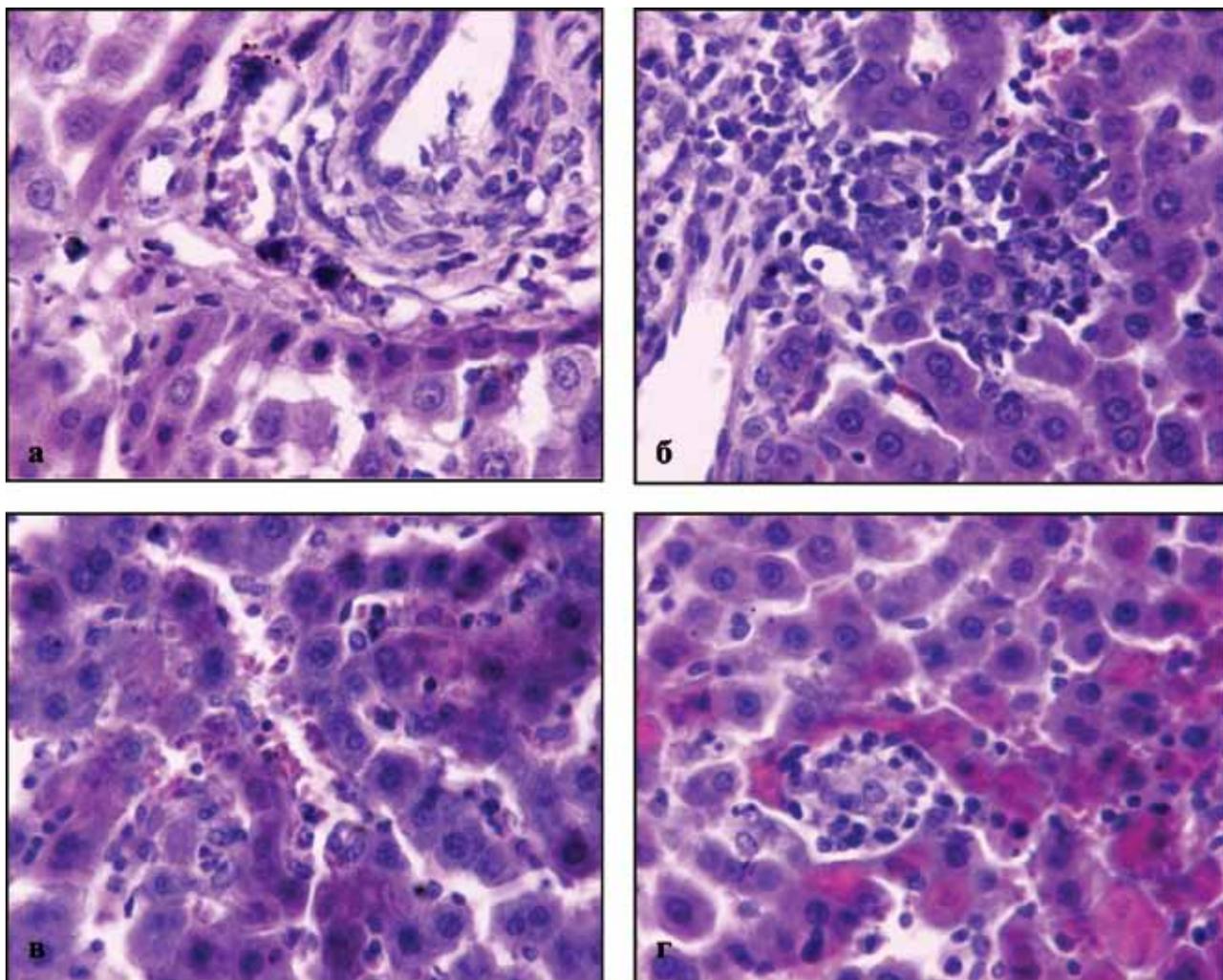
**Целью** настоящего исследования является изучение параметров метастатического поражения печени в динамике на фоне спонтанного развития карциносаркомы Walker 256.

**Материалы и методика**

Эксперименты проведены на 28 крысах-самцах Wistar массой 180-200 г, которым в мышцу бедра осуществляли трансплантировали  $10^6$  клеток карциносаркомы Walker 256 (W256) [3]. Образцы печени для исследования забирали на 5, 7 и 14 сутки после перевивки опухоли. В качестве контроля использовали интактных крыс. Животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом, все манипуляции проводили с соблюдением международных принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным и взятие образцов печени, изготовление и окраску гистологических препаратов (гематоксилином Майера-эозином) проводили по стандартным методикам. Для электронно-микроскопического исследования образцы фиксировали в 4% параформальдегиде на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) при комнатной температуре в течение 2 ч, промывали 15 мин в охлажденном буфере, затем дополнительно фиксировали на льду 1 ч в 1% растворе четырехоксида осмия на том же буфере. После дегидратации в серии спиртов возрастающей концентрации образцы заключали в эпон-812. На ультратоме LKB-8800 получали полутонкие (1 мкм) и ультратонкие (35-45 нм) срезы. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим. Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата при 40°C в течение 40 мин и цитратом свинца при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 20 мин. Контрастированные срезы напыляли слоем углерода в вакууме и исследовали в электронном микроскопе JEM-100S при ускоряющем напряжении 80 кВ. Интенсивность процесса метастазирования в ткани печени оценивали по нескольким параметрам: число метастатических поражений в тестовой площади ( $1,16 \times 10^5$  мкм<sup>2</sup>), площадь метастазов ( $S_{мет}$ ), частота метастазирования (ЧМ), % – отношение числа животных с метастазами к общему количеству животных в группе и индекс ингибирования метастазирования (%):  $(A_k B_k - AB) / A_k B_k \times 100\%$ , где  $A_k$  – частота метастазирования в контрольной группе,  $A$  – частота метастазирования в опытной группе,  $B_k$  – среднее число метастазов у животных контрольной группы,  $B$  – среднее число метастазов у животных опытной группы [1]. Статистическая обработка результатов заключалась в подсчете средних величин ( $M$ ) и их стандартных ошибок ( $m$ ).

**Результаты и обсуждение**

В группах животных со спонтанным развитием карциносаркомы W256, наблюдали закономер-



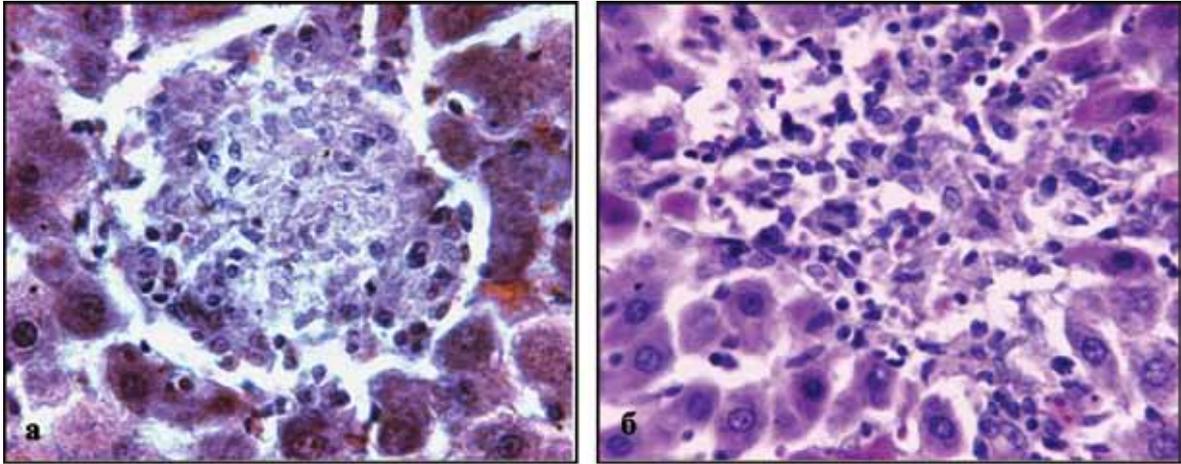
**Рис. 1.** Печень крысы Wistar с карциносаркомой Walker 256, 5-е сут развития опухоли: **а** – клетки карциносаркомы и макрофаги в портальной строме; **б** – распространение опухолевых клеток из портальных трактов в паренхиму дольки; **в** – миграция клеток опухоли по синусоидам печеночной дольки; **г** – формирование метастазов клетками карциносаркомы Walker 256 в перипортальных зонах печеночных долек. Окраска гематоксилином Майера и эозином. Ув. 400.

ности прогрессирования опухолевого процесса: клетки карциносаркомы W256 распространялись в системе кровотока через приносящие сосуды печени (рис. 1, а) с последующей миграцией из зоны портальных трактов в перипортальные области печеночных долек (рис. 1, б). Уже на 5-е сутки после инокуляции карциносаркомы W256 в сосудах портальных трактов обнаруживались одиночные опухолевые клетки и их скопления, которые, по мере усиления инвазии, мигрировали по синусоидам печеночных долек (рис. 1, в) и далее, повреждая близлежащие клетки, проникали в паренхиму печени (рис. 1, г).

Метастатические клетки делились с образованием конгломератов, нарушающих гепатоцитарные балки, что приводило к изменению архитектоники органа (рис. 2, а). Скопления опухолевых клеток чаще встречались на 7 и 14 сутки спонтанного развития карциносаркомы W256, параллельно увеличивалась частота метастазирования (табл. 1.). Рост опухоли стимулировал в печени естественную цитотоксическую активность. Так,

на 7 сутки после имплантации опухолевой культуры в печени наблюдалась выраженная инфильтрация печени клетками лимфоидного ряда с участием макрофагов, моноцитов, эозинофилов, нейтрофилов, тучных клеток, которые перемещались в область скоплений опухолевых клеток, осуществляя их лизис (рис. 2, б).

В табл. 1 представлены данные морфометрического исследования микрометастазов печени у животных со спонтанным развитием карциносаркомы W256. По мере роста новообразования было показано возрастание частоты метастазирования, максимальное на 14 сутки после имплантации опухоли. При анализе площади метастазов было выявлено снижение данного показателя на 7 сутки, что может быть обусловлено активацией естественных цитотоксических механизмов в печени. Динамика изменений индекса ингибирования метастазирования соответствовала интенсификации образования метастазов на более поздних стадиях развития опухоли.



**Рис. 2.** Печень крысы Wistar с карциносаркомой Walker 256, 7 сутки развития опухоли: **а** – внутريدольковый метастаз карциносаркомы; ацидофильная дистрофия перифокальных гепатоцитов; **б** – воспалительная инфильтрация опухолевого очага, лизис опухолевых клеток; дезинтеграция и ацидофильная дистрофия гепатоцитов. Окраска гематоксилином Майера и эозином. Ув. 400.

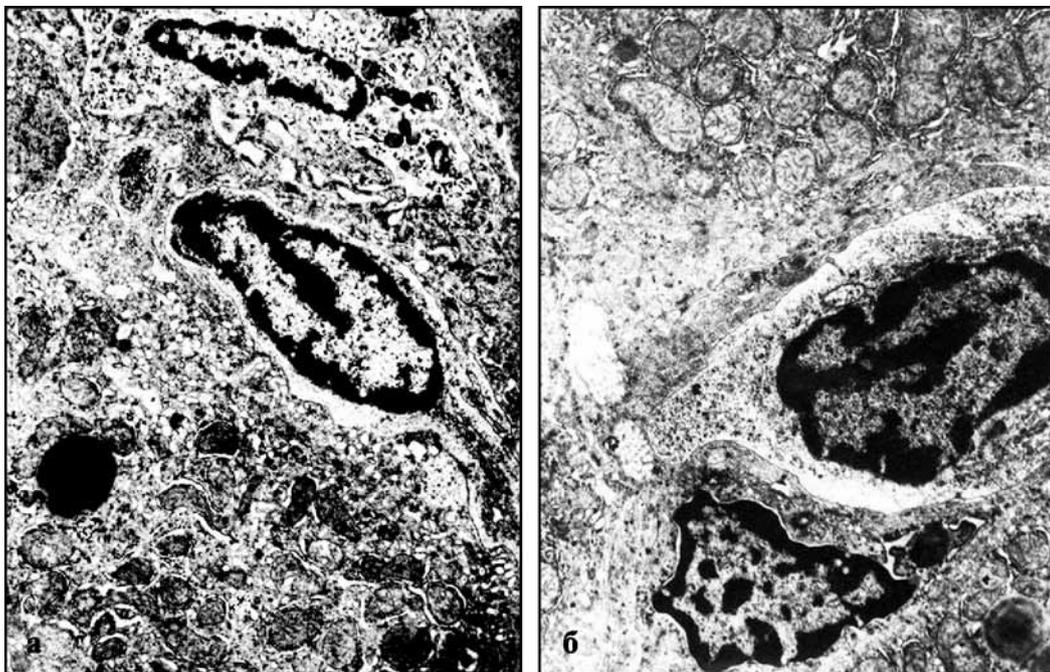
**Таблица 1**  
**Морфометрические параметры микрометастазов с карциносаркомой Walker 256 в печени крыс Wistar**

Показатель	Время после инокуляции карциносаркомы		
	5 сутки	7 сутки	14 сутки
Частота метастазирования, %	14,29	42,86	57,14
Число метастазов, Nмет	8	6	15
Площадь метастазов, Sмет	155,08±4,45	150,65±5,70	155,21±5,09
Индекс ингибирования метастазирования, %	0,00	-125,00	-650,00

Примечание: Sмет – площадь метастазов (мкм<sup>2</sup>), M±m; ИИМ – индекс ингибирования метастазирования относительно срока 5 сут развития карциносаркомы Walker 256.

Электронномикроскопическое исследование печени на 5-е сутки после инокуляции опухоли выявило присутствие опухолевых клеток в синусоидах. Субклеточные особенности таких клеток соответствовали определенным ранее [2] признакам 4-й стадии дифференцировки клеток карциносаркомы W256 II типа регрессивного роста с характерным вытянутым ядром и маргинальным гетерохроматином, увеличением количества лизосом с повышением их объемной плотности и удлинением микроворсинок.

На 7 сутки обнаруживались метастазные клетки с ундулирующими плазмалеммами чаще регрессивного роста, как I, так и II типа дифференцировки с выраженной апоптотической конденсацией хроматина ядер, скоплениями в ци-



**Рис. 3.** Печень крысы Wistar с карциносаркомой Walker 256, 7 сутки развития опухоли: **а** – миграция опухолевых клеток в паренхиму. Электронограмма. Ув. 12 000; **б** – клетка Ито (внизу) с признаками апоптоза; опухолевая клетка; фрагмент гепатоцита с агрегированными мембранными органеллами. Электронограмма. Ув. 10 000.

топлазме лизосом (рис. 3, а). Обладая высокой пенетрационной способностью, они перемещались из синусоидного пространства в пространство Диссе, содержащее фибриллы коллагена (рис. 3, б). Обнаружены коротко-дистантные взаимодействия клеток карциносаркомы W256 с гепатоцитами дезинтегративного характера, подчеркивающие нарушения ультраструктуры гепатоцитов, прилежащих к метастатическим клеткам (рис. 3, а). Кроме того, клетки карциносаркомы W256 контактировали и с клетками синусоидов, вызывая их апоптозную трансформацию (рис. 3, б).

Микроокружение тканей опухоленосителя играет важную роль в прогрессии опухоли. Оно может способствовать ее распространению путем содействия в неоваскуляризации, обеспечивая всеми необходимыми ростовыми факторами метастатические клетки. Местные опухоль-фильтрующие клетки воспаления хозяина являются неотъемлемой частью микроокружения опухоли и могут участвовать в регуляции опухолевого роста, высвобождения провоспалительных цитокинов и хемокинов, проангиогенных факторов и протеиназ, участвующих в деградации экстрацеллюлярного матрикса [4]. При спонтанном развитии карциносаркомы Walker 256 в печени были выявлены признаки воспалительных реакций, усиливающихся на поздних стадиях роста опухоли. Следует отметить, что на 5 и 7 сутки после имплантации опухоли наблюдалась выраженная инфильтрация печени клетками лимфоидного ряда с участием макрофагов, моноцитов, эозинофилов, нейтрофилов, тучных клеток, которые перемещались в область скопления опухолевых клеток, осуществляя их лизис. Это свидетельствовало об активации естественных цитотоксических механизмов печени, противостоящих онкофакторам на ранних стадиях роста новообразования, которые нивелировались к 14 суткам опыта.

Таким образом, инокуляция карциносаркомы Walker 256 крысам Wistar приводила к метастатическому поражению печени, наиболее выраженному на поздних стадиях развития опухоли. Длительное воздействие факторов паранеопластической интоксикации при прогрессировании процесса усугубляло функциональное напряжение гомеостатических систем организма, что сопровождалось снижением защитных цитотоксических реакций в печени на продвинутых стадиях карциносаркомы Walker 256.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Архипов С.А., Юнкер В.М., Груntenко Е.В. Ингибирующее влияние трансплантированной опухоли на развитие метастазов в легких у мышей // *Вопр. онкол.* – 1982. – Т. 28. – С. 44 – 48.
2. Овсянко Е.В., Ефремов А.В., Мичурина С.В. и др. Ультраструктурный и стереологический анализ клеток карциносаркомы WALKER 256 на разных стадиях их дифференцировки // *Бюлл. эксп. биол.* – 2009. – Т. 148. – С. 337 – 342.
3. Хегай И.И., Попова Н.А., Иванова Л.Н. Влияние экспрессии гена вазопрессина на рост карциносаркомы Walker 256 у крыс // *Генетика.* – 2000. – Т. 42. – С. 993 – 995.
4. Auguste P., Fallavollita L., Wang N. et al. The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation // *Amer. J. Pathol.* – 2007. – Vol. 170. — P. 1781 – 1792.
5. Enomoto T., Oda T., Aoyagi Y. et al. Consistent liver metastases in a rat model by portal injection of microencapsulated cancer cells // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66. – P. 11131 – 11139.
6. Pandharipande P.V., Krinsky G.A., Rusinek H., Lee V.S. Perfusion imaging of the liver: current challenges and future goals // *Radiol.* – 2005. – Vol. 234. – P. 661 – 673.

Поступила в редакцию 11.10.2013 г.

*T.A. Kunts, A.V. Efremov, E.V. Ovsyanko,  
M.G. Pustovetova*

#### **The evaluation of metastatic damage of the liver of the Wistar rats under conditions of spontaneous development of the Walker 256 carcinosarcoma**

State Medical University, Novosibirsk

There was held micro- and ultrastructural study of the liver of the Wistar rats in the dynamics of development of transplantable Walker 256 carcinosarcoma. The regularities of the progression of the tumor process in the form of liver metastases with appearance of intralobular metastases. In the early stages of tumor development it was marked activation of cytotoxic function of the liver with necrosis of tumor lesions accompanied by a decrease of the structural density of metastases. In advanced stages of development of the Walker 256 carcinosarcoma an estimation of parameters of tumor invasion in the liver showed an intensification of these processes with increased severity of inflammatory reactions.

Key words: liver, Walker 256 carcinosarcoma, metastases, ultrastructure