

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИФИТОАДАПТОГЕНА НА ЛЕЙКОЦИТАРНУЮ ИНФИЛЬТРАЦИЮ ГЕПАТОКАРЦИНОМ МЫШЕЙ

Р.В. Карпова¹, Е.В. Бочаров¹, О.А. Бочарова¹, И.В. Казеев¹, В.Г. Кучеряну², Ю.Н. Соловьев¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

Контакты: Регина Васильевна Карпова planta39@rambler.ru

Цель исследования — морфологическое изучение ткани печени мышей линии СВА на разных этапах онтогенеза и при лечебном воздействии жидкой формы мультифитоадаптогена.

Материалы и методы. Объект исследования — образцы печени мышей-самцов линии СВА (сублиния СВА/ЛасУ). Опытные мыши получали (курсами) 10 % водный раствор мультифитоадаптогена с 6-месячного возраста до естественной гибели животных. Образцы ткани фиксировали в нейтральном забуференном формалине и заключали в парафин. Срезы с парафиновых блоков окрашивали гематоксилином и эозином. Определяли строение печени, а также степень лейкоцитарной инфильтрации в опухолевой ткани.

Результаты. У мышей-самцов СВА были выявлены опухоли, по морфологическому строению представляющие собой умеренно-дифференцированные трабекулярные гепатокарциномы (в возрасте 8 мес) и низкодифференцированные трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы (в возрасте 22 мес). У опытных животных в обеих временных точках в гепатокарциномах морфологически определена лейкоцитарная инфильтрация, которую оценивали количественно. Более высокий уровень лейкоцитарной инфильтрации у животных в опыте сочетался с деструктивными процессами в опухоли.

Заключение. Лейкоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей-самцов СВА может иметь значение для снижения частоты опухолеобразования у животных высокоракковых линий.

Ключевые слова: гепатокарцинома, лейкоцитарная инфильтрация, мыши-самцы СВА, фитоадаптогены (женьшень, родиола, элеутерококк)

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-60-65

THE INFLUENCE OF MULTIPHYTOADAPTOGEN ON LEUKOCYTE INFILTRATION IN MICE HEPATOCARCINOMAS

R. V. Karpova¹, E. V. Bocharov¹, O. A. Bocharova¹, I. V. Kazeev¹, V. G. Kucheryanu², Yu. N. Soloviev¹

¹N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of Russia;

24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²Institute of general pathology and pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia

The aim of this study was the morphological investigation of the CBA mice liver tissue at different stages of ontogenesis as well as during liquid form multifitoadaptogen therapeutic administration.

Materials and methods. The study objects are the liver samples of CBA male mice (subline CBA/LacY). Experimental animals received a 10 % solution of multifitoadaptogen from 6 months of age until natural death. Tissue samples were fixed in neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Sections from paraffin blocks were stained with hematoxylin and eosin. The structure of the liver tumours was determined as well as the quantitative degree of leukocyte infiltration in the tumour tissue.

Results. The tumours morphologically structured as moderately differentiated trabecular hepatocarcinomas (at 8 months of age) and low differentiated trabecular-acinar hepatocarcinomas (aged 22 months) were revealed in CBA male mice. Higher level of leukocyte infiltration in hepatocarcinomas of experimental animals was determined.

Conclusion. Leukocyte infiltration may be important for antitumour immune reaction as well as for reduction of the tumour formation incidence in high-cancer mice.

Key words: hepatocarcinomas, leukocyte infiltration, CBA male mice, phytoadaptogens (ginseng, rhodiola, eleutherococcus)

Введение

Снижение активности иммунных эффекторов в отношении опухолевых клеток может быть обусловлено ослаблением контактных взаимодействий гистонеспецифических мембраносвязанных молекул адгезии ICAM-1 с их лигандами — лейкоцитарными интегринами, в частности LFA-1 и Mac-1 [1–3]. Вместе с тем предполагается участие цитокинов в прогрессии и метастазировании опухолей. Так, повышенный уровень интерлейкинов (ИЛ) 6 и 10 сопровождается подавлением противоопухолевых иммунных реакций [4, 5].

Данная работа продолжает серию статей, посвященных изучению нарушения адгезионных взаимодействий между клетками иммунной системы и опухолью с участием цитокинов ИЛ-6 и -10, а также возможности их коррекции на примере воздействия нетоксичного мультифитоадаптогена (МФА). Известна способность фитоадаптогенов регулировать межклеточную адгезию, нормализуя процессы дифференцировки тканей, усиливать иммунологическую реактивность организма в отношении опухолей, проявляя противоопухолевый эффект [6, 7].

В предыдущих работах на модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей-самцов линии СВА [8] было показано, что развитие опухолей сопровождается снижением в онтогенезе экспрессии лейкоцитарных интегрин LFA-1 и Mac-1, а также возрастанием сывороточного уровня супрессорных ИЛ-6 и -10. Воздействие МФА как в профилактическом режиме (в течение 1-го месяца жизни), так и в лечебном (с возраста 6 мес до естественной гибели животных) приводило к долговременному усилению экспрессии LFA-1 и Mac-1, подавлению сывороточного уровня ИЛ-6 и -10, снижению уровня наследственного опухолеобразования (количества и размеров гепатокарцином по сравнению с животными контрольной группы) [9, 10].

При морфологическом исследовании гепатокарцином животных, получавших МФА профилактически, в опухолевой ткани была определена лейкоцитарная инфильтрация, а также выявлены деструктивные участки [11].

Цель исследования — морфологическое изучение ткани печени мышей-самцов линии СВА на разных этапах онтогенеза при лечебном воздействии жидкой формы МФА.

Материалы и методы

В исследование были включены опытная ($n = 80$) и контрольная ($n = 90$) группы мышей-самцов линии СВА (сублиния СВА/Лас Y). Источник получения животных — локальная колония Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Мыши контрольной группы по-

лучали в качестве питья воду, животные опытной группы — 10 % водный раствор МФА с возраста 6 мес (периода появления первых опухолей) до естественной гибели животных.

Мышей (по 15 из каждой группы) выводили из эксперимента в возрасте 4, 8, 22 мес. Остальные животные находились под наблюдением до их естественной гибели. Образцы ткани печени фиксировали в нейтральном забуференном формалине и заключали в парафин. Срезы с парафиновых блоков окрашивали гематоксилином и эозином для проведения гистологического исследования.

При оценке гистологических препаратов определяли строение печени, а также степень лейкоцитарной инфильтрации в опухолевой ткани.

Количественную оценку лейкоцитарной инфильтрации проводили путем подсчета у каждого животного числа клеток не менее чем в 10 репрезентативных полях зрения в областях наиболее интенсивного окрашивания при увеличении микроскопа 400. Определяли среднее количество клеток в 1 поле зрения. Затем оценивали средний показатель с учетом общего числа животных в группе.

Мультифитоадаптоген — стандартизованная фармацевтическая композиция на основе компонентов экстрактов 40 растений (включая фитоадаптогены женьшень, элеутерококк, родиолу розовую и др.), в состав которых входят в том числе соединения фенольной природы (флавоноиды, тритерпеновые гликозиды и др). МФА обладает антиоксидантными, антимуtagenными, антистрессорными, гормономодулирующими, противоопухолевыми, иммуномодулирующими, в том числе адгезиогенными и интерферогенными свойствами [12–17].

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA 6.0.

Результаты

У животных обеих групп в возрасте 4 мес опухолей не выявлено. Примеры микропрепаратов ткани печени животных контрольной и опытной групп в этом возрасте изображены на рис. 1. Представленная морфологическая картина характерна для нормальной ткани печени. При этом у животных 2 групп она не различалась.

Примеры строения гепатом у мышей обеих групп в возрасте 8 мес приведены на рис. 2. Опухоли представляют собой умеренно дифференцированные трабекулярные гепатокарциномы — опухолевые клетки с относительно крупными ядрами образуют тяжи и трабекулы. В опухолевой ткани животных контрольной группы выявлены единичные лейкоциты (см. рис. 2а). На гистологическом срезе гепатокарциномы опытного животного (см. рис. 2б) видна инфильтрация опухоли лейкоцитами (судя по однородным

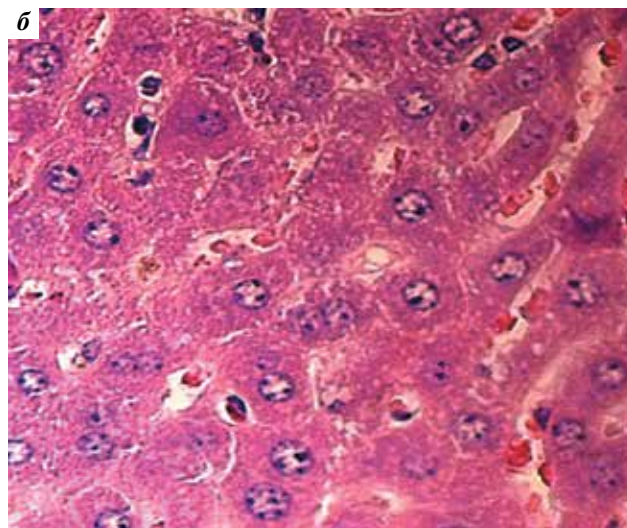
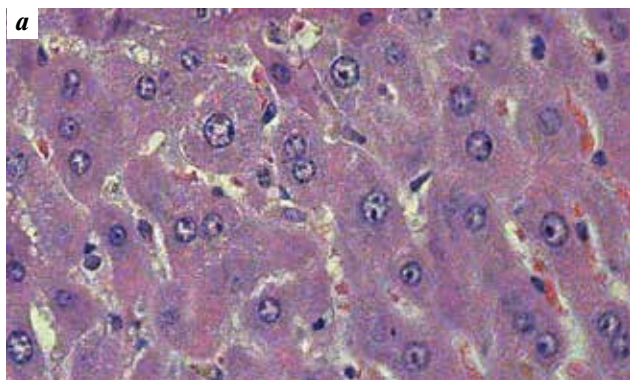


Рис. 1. Микроскопическое строение ткани печени животного в возрасте 4 мес: а — контрольной группы; б — опытной группы. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$

Fig. 1. Microscopic structure of the animal's liver at 4 months of age: а — control group; б — study group. Hematoxylin and eosin staining; $\times 400$

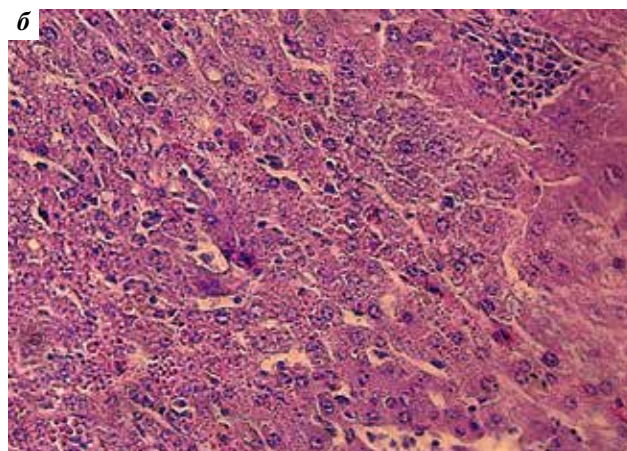
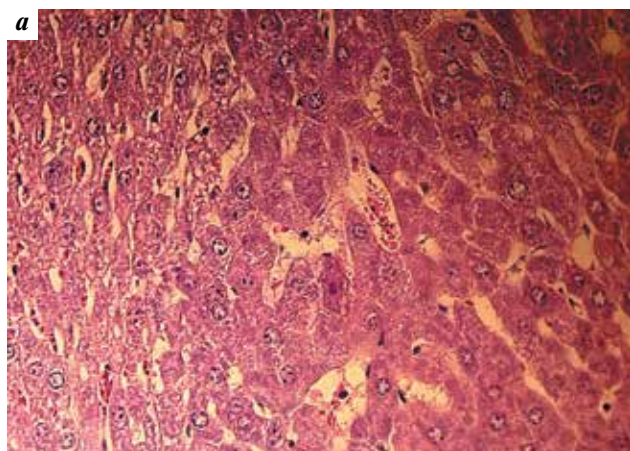


Рис. 2. Умеренно-дифференцированная трабекулярная гепатокарцинома у мышей СВА в возрасте 8 мес: а — образец печени контрольного животного; б — образец печени животного опытной группы (под воздействием мультифитоадаптогена). Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$

Fig. 2. Moderately differentiated trabecular hepatocellular carcinoma in CBA mice aged 8 months: а — liver sample of a control animal; б — liver sample of a study animal (under the effect of multiphytoadaptogen). Hematoxylin and eosin staining; $\times 400$

крупным клеточным ядрам, активированными лимфоцитами) в виде тяжей или локальных скоплений клеток.

На рис. 3 продемонстрированы примеры гистологических препаратов опухолей мышей обеих групп в позднем онтогенезе (в возрасте 22 мес). В данном случае визуализируются низкодифференцированные опухоли смешанного строения — трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы. Полиморфные клетки, расположенные в виде трабекул, имеют гиперхромные ядра, между трабекулами располагаются атипичные полости (ацинусы). У мышей опытной группы, получавших МФА в лечебном режиме, на срезе опухолевой ткани (см. рис. 3б) видны участки, инфильтрированные лейкоцитами. У животных контрольной группы лейкоцитарную инфильтрацию наблюдали в минимальных количествах.

В таблице приведены количественные показатели инфильтрации гепатокарцином лейкоцитами у мышей обеих групп в возрасте 8 и 22 мес. У контрольных животных как в 8 мес, так и в 22 мес в поле зрения наблюдались единичные лейкоциты ($1,3 \pm 0,1$ и $2,3 \pm 0,2$ клетки соответственно). У мышей опытной группы, получавших МФА с 6 мес, лейкоцитарная инфильтрация гепатокарцином более многочисленна в обоих возрастных периодах ($12,1 \pm 1,0$ и $123,6 \pm 11,0$ соответственно).

Следует отметить, что в контрольной группе животных частота опухолеобразования в возрасте 22 мес составила 100 %, в то время как у животных 2-й группы в этом возрасте частота опухолеобразования (70 %) была статистически достоверно ниже. При этом средний объем опухолевой массы на мышь также был достоверно ниже, чем в контрольной группе [10].

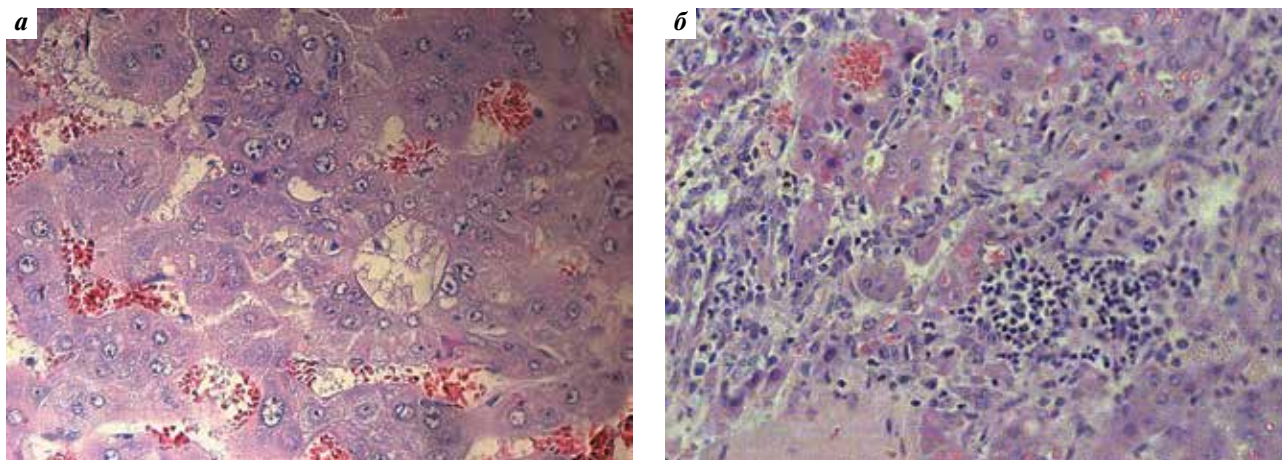


Рис. 3. Трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома у мышей СВА в возрасте 22 мес: а — образец печени контрольного животного; б — образец печени животного опытной группы (под воздействием мультифитоадаптогена). Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$

Fig. 3. Trabecular acinar hepatocellular carcinoma in CBA mice aged 22 months: a — liver sample of a control animal; б — liver sample of a study animal (under the effect of multiphytoadaptogen). Hematoxylin and eosin staining; $\times 400$

Количественные показатели инфильтрации гепатокарцином лейкоцитами под воздействием мультифитоадаптогена у мышей СВА в возрасте 8 и 22 мес

Quantitative characteristics of hepatocellular carcinoma infiltration by leukocytes under the effect of multiphytoadaptogen in CBA mice aged 8 and 22 months

Группы Groups	Число мышей, n Number of mice, n	Возраст мышей, мес Age of mice, months	Количество ОИЛ в поле зрения ($M \pm m$) Number of TIL in the field of vision ($M \pm m$)	Min—Max количество ОИЛ в поле зрения Min—Max number of TIL in the field of vision
Контрольная группа Control group	15	8	$1,3 \pm 0,1$	0—3
	15	22	$2,3 \pm 0,2$	0—5
Мультифито-адаптоген с 6 мес Multiphytoadaptogen since age 6 months	15	8	$12,1 \pm 1,0$	0—40
	15	22	$123,6 \pm 11,0$	10—570

Примечание. ОИЛ — опухолеинфильтрирующие лейкоциты.
Note. TIL stands for tumor-infiltrating leukocytes.

Данные результаты указывают на то, что наличие опухолеинфильтрирующих лейкоцитов в гепатокарциномах мышей при воздействии МФА может иметь значение для подавления опухолевого процесса.

Вместе с тем наличие лейкоцитарной инфильтрации гепатокарцином у мышей СВА под воздействием МФА в лечебном режиме сочеталось с нормализацией иммуноадгезионных параметров, а именно с повышением экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках крови и снижением сывороточного содержания соответствующих цитокинов (ИЛ-6 и -10) [9].

Обсуждая полученные результаты, следует отметить, что миграция в опухолевую ткань активированных лимфоцитов может служить положительным прогностическим признаком опухолевого процесса [18, 19].

Результаты ряда исследователей говорят в пользу того, что инфильтрация опухоли цитотоксическими

лимфоцитами может быть обеспечена усилением экспрессии лейкоцитарных интегринов, в том числе LFA-1 и Mac-1. Вместе с тем и молекулы адгезии ICAM-1, -2, -3, выступающие в роли контррецепторов лейкоцитарных интегринов на клетках опухоли, также могут индуцировать их экспрессию при участии ряда цитокинов (ИЛ-6, -10, -12, интерферона- γ , фактора некроза опухоли и др.) [20].

Очевидно, снижение частоты опухолеобразования у мышей СВА при лечебном воздействии жидкой формы МФА можно объяснить в том числе выраженной лейкоцитарной инфильтрацией гепатокарцином.

Однако на данном этапе работы остался невыявленным фенотип клеток, инфильтрирующих опухоль, а также вопрос о том, экспрессированы ли на этих клетках, в частности, молекулы лейкоцитарных интегринов при использовании МФА. Этот вопрос будет являться предметом дальнейших исследований.

Вместе с тем можно предположить, что в данном случае в опухоль мигрируют цитотоксические CD8⁺-лимфоциты, что согласуется с подавлением образования гепатокарцином в опытной группе. Также важно проследить корреляционную связь инфильтрации опухоли лимфоцитами с продолжительностью жизни мышей СВА, предрасположенных к спонтанному образованию гепатом.

Выводы

Лейкоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей-самцов линии СВА под воздействием жидкой формы МФА в лечебном режиме (начиная с возраста 6 мес и до естественной гибели животных) может иметь значение для снижения частоты опухолеобразования у высокоракковых животных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бочарова О.А., Карпова Р.В. Адгезия в биологии рака. Российский биотерапевтический журнал 2006;5(3):55–60. [Bocharova O.A., Karpova R.V. Adhesion in cancer biology. Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2006;5(3):55–60 (In Russ.)].
2. Ramos T.N., Bullard D.C., Barnum S.R. ICAM-1: Isoforms and Phenotypes. J Immunol 2014;192(10):4469–74. DOI: 10.4049/jimmunol.1400135.
3. Mitsou I., Mulhaupt H., Couchman J.R. Proteoglycans, ion channels and cell-matrix adhesion. Biochem J 2017;474(12):1965–79. DOI: 10.1042/BCJ20160747.
4. Brady J., Carotta S., Thong R. et al. The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. J Immunol 2010;185(11):6679–88. DOI: 10.4049/jimmunol.0903354.
5. Pop V.V., Seicean A., Lupan I. et al. IL-6 roles – Molecular pathway and clinical implication in pancreatic cancer – A systemic review. Immunol Lett 2017;181:45–50. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.11.010.
6. Guo, L., Song L., Wang Z. et al. Panaxydol inhibits the proliferation and induces the differentiation of human hepatocarcinoma cell line HepG2. Chem Biol Interact 2009;181(1):138–43. DOI: 10.1016/j.cbi.2009.04.015.
7. Shanmugam M.K., Lee J.H., Chai E.Z. et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. Semin Cancer Biol 2016;40:1:35–47. DOI: 10.1155/2018/1617202.
8. Модянова Е.А., Бочарова О.А., Маленков А.Г. Профилактическое действие контактинов-кейлонов на спонтанный канцерогенез у линий мышей. Экспериментальная онкология 1983;5(3):39–42. [Modyanova E.A., Bocharova O.A., Malenkov A.G. The kontaktins-chalones preventive action on spontaneous carcinogenesis in mice inbred strains. Eksperimentalnaya onkologiya = Experimental oncology 1983;5(3):39–42. (In Russ.)].
9. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А. и др. Лейкоцитарные интегрин при гепатоканцерогенезе мышей высокоракковой линии СВА. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(3):53–6. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Il'yenko V.A. et al. Leukocyte integrins at hepato carcinogenesis in high-cancer CBA strain of mice. Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2013;12(3):53–6. (In Russ.)].
10. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.В. и др. Снижение возникновения гепатом при воздействии фитоадаптогена у высокоракковых мышей СВА. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(2):73–6. [Bocharova O.A., Bocharov E.V., Karpova R.V. et al. Reduced occurrence of hepatomas in phytoadaptogen exposed high-cancer CBA strain of mice. Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(2):73–6. (In Russ.)].
11. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Вершинская А.А. и др. Лимфоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей высокоракковой линии СВА при воздействии мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(2):85–90. [Bocharov E.V., Karpova R.V., Vershinskaya A.A. et al. Hepatocarcinomas infiltration lymphocytes in high-cancer CBA mice when multiphytoadaptogen exposed in early postnatal ontogenesis. Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(2):85–90. (In Russ.)].
12. Бочарова О.А., Пожарицкая М.М., Чекалина Т.Л. и др. Роль адгезионных нарушений в патогенезе лейкоплакии и возможности их коррекции иммуномодулятором. Иммунология 2004;25(1):36–43. [Bocharova O.A., Pozharitskaya M.M., Chekalina T.L. et al. The role of adhesive disorders in the pathogenesis of leukoplakia and the possibility of their correction by a nonspecific immunomodifier. Immunologiya = Immunology 2004;25(1):36–43. (In Russ.)].
13. Чулкова С.В., Бочарова О.А., Клименков А.А. и др. Возможности повышения эффективности комплексного лечения распространенного рака желудка фитоадаптогеном. Российский биотерапевтический журнал 2006;5(2):85–92. [Chulkova S.V., Bocharova O.A., Klimenkov A.A. et al. Possibilities of increasing the effectiveness of integrated treatment of advanced gastric cancer by phytoadaptogen. Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2006;5(2):85–92. (In Russ.)].
14. Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н. и др. Влияние комплексного фитоадаптогена на МФТП-индуцированный паркинсонический синдром у мышей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2006;141(5):495–8. [Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Kryzhanovskiy G.N. et al. Effect of complex phytoadaptogen on MPTP-induced parkinson syndrome in mice. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2006;141(5):495–8. (In Russ.)].
15. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Шейченко В.И. и др. Возможность использования электронных спектров поглощения для стандартизации многокомпонентного препарата «Фитомикс-40». Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии 2007;5(2):20–5. [Shejchenko O.P., Bocharova O.A., Shejchenko V.I. The possibility of electronic absorption spectra for the multi-component preparation "Phytomix-40" standardization. Voprosy biologicheskoy meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2007;5(2):20–5. (In Russ.)].

16. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии 2012;(10):52–9. [Shejchenko O.P., Bocharova O.A., Krapivkin B.A. et al. Study of complex phytoadaptogen by HPLC method. Voprosy biologicheskoy meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2012;(10):52–9. (In Russ.)].
17. Куренная О.Н., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромицетов. Генетика 2013;49(12):1364–69. [Kurennaya O.N., Karpova R.V., Bocharova O.A. et al. Multiphytoadaptogen antimutagenesis in yeast cells of Saccharomyces. Genetika = Russian Journal of Genetics 2013;49(12):1364–69 (In Russ.)].
18. Lu, P., Zhu X.Q., Xu Z.L. et al. Increased infiltration of activated tumor-infiltrating lymphocytes after high intensity focused ultrasound ablation of human breast cancer. Surgery 2009;145(3):286–93. DOI: 10.1016/j.surg.2008.10.010.
19. Sasada T., Suekane S. Variation of tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers: controversy on clinical significance. Immunotherapy 2011;3(10):1235–51. DOI: 10.2217/imt.11.106.
20. Oble D., Loewe R., Yu P., Mihm M. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. Cancer Immun 2009;9(3):245–51.

ORCID авторов / ORCID of authors

Р.В. Карпова / R.V. Karpova: <https://orcid.org/0000-0003-4893-1472>
Е.В. Бочаров / E.V. Bocharov: <https://orcid.org/0000-0003-2342-9881>
О.А. Бочарова / O.A. Bocharova: <https://orcid.org/0000-0002-6365-2888>
В.Г. Кучеряну / V.G. Kucheryanu: <https://orcid.org/0000-0002-5071-3581>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. 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: 13.12.2018. Принята в печать: 12.04.2019.

Article received: 13.12.2018. Accepted for publication: 12.04.2019.