

УДК 616.36-006-092.9:615.322:599.324.4

Е.В. Бочаров^{1,2}, Р.В. Карпова¹, А.А. Вершинская¹, В.Г. Кучеряну², О.А. Бочарова¹**ЛИМФОЦИТАРНАЯ ИНФИЛЬТРАЦИЯ ГЕПАТОКАРЦИНОМ МЫШЕЙ
ВЫСОКОРАКОВОЙ ЛИНИИ CBA ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МУЛЬТИФИТОАДАПТОГЕНА
В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**¹ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва²ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва**Контактная информация**

Бочарова Ольга Алексеевна, д.б.н., проф., зав. лабораторией иммунофармакологии НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(499) 324-55-26

e-mail: imufarm@rambler.ru

Статья поступила 16.04.2015, принята к печати 27.04.2015.

Резюме

В статье представлены результаты морфологического исследования ткани печени мышей высокоракковой линии CBA на разных этапах онтогенеза при воздействии мультифитоадаптогена в течение 1 месяца жизни. Выявлены умеренно- и низкодифференцированные трабекулярные и трабекулярно-ацинарные гепатокarciномы. У мышей опытной группы в возрасте 22 мес определена лимфоцитарная инфильтрация гепатокarciном, а также деструкция опухолевых узлов. У мышей контрольной группы инфильтрации и деструкции гепатокarciном не наблюдали.

Ключевые слова: высокоракковая линия мышей CBA, трабекулярные и трабекулярно-ацинарные гепатокarciномы, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, фитоадаптогены.

E.V. Bocharov^{1,2}, R.V. Karpova¹, A.A. Vershinskaya¹, V.G. Kucheryanu², O.A. Bocharova¹**LYMPHOCYTE INFILTRATION
IN HIGH-CANCER CBA MICE HEPATOCARCINOMAS
USING MULTIPHYTOADAPTOGENE EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS ADMINISTRATION**¹FSBSI «N.N. Blokhin Russib Cancer Research Center», Moscow²FSBSI «The institute of general pathology and pathophysiology», Moscow**Abstract**

The article presents the results of high-cancer CBA inbred mice liver morphological research while using multiphytoadaptogene early postnatal ontogenesis administration. Moderate and poorly differentiated trabecular and trabecular-acinar hepatocarcinomas were determined. Lymphocytes infiltration and destructive features were microscopically visible in hepatocarcinomas at the age of 22 months. Infiltrated lymphocytes and destructive features in control mouse hepatocarcinomas were not detected.

Key words: high-cancer CBA inbred mice, trabecular and trabecular-acinar hepatocarcinomas, tumours infiltrated lymphocytes, phytoadaptogenes.

Введение

В предыдущих исследованиях на модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей-самцов высокоракковой линии CBA было выявлено снижение в онтогенезе экспрессии молекул лейкоцитарных интегринов *LFA-1* (CD11a/CD18) и *Mac-1* (CD11b/CD18), обеспечивающих контактные взаимодействия эффекторов иммунитета и опухолевых клеток. Вместе с тем определено возрастание сыровоточного уровня интерлейкинов -6 и -10 [11; 12].

Применение МФА фитомикса-40 у высоко-раковых мышей CBA в раннем постнатальном онтогенезе в течение первого месяца жизни, захватывая завершающий период дифференцировки нор-

мальной ткани печени, способствовало усилению экспрессии молекул *LFA-1* и *Mac-1*, подавлению сыровоточных уровней ИЛ-6 и ИЛ-10, снижению уровня наследственного опухолеобразования, количества и размеров гепатокarciном по сравнению с контрольными животными. Применение МФА, начиная с 6 мес постнатального развития (периода возникновения первых гепатом) и до естественной гибели животного, также приводило к коррекции показателей лейкоцитарных интегринов *LFA-1* и *Mac-1*, ИЛ -6 и -10, снижению частоты возникновения и размеров гепатокarciном, не влияя на их количество у одного животного [11; 12; 13].

Целью настоящей работы явились морфологические исследования печени высокоракковых

мышей-самцов линии *СВА*, генетически предрасположенных к развитию спонтанных гепатом, при введении МФА в течение первого месяца постнатального развития.

В задачи работы входила оценка морфологических изменений в ткани печени мышей линии *СВА* на разных этапах онтогенеза при воздействии МФА.

Материалы и методы

Работу проводили на мышах-самцах высоко-раковой инбредной линии *СВА* (сублиния *СВА/Lac Y*; [3; 4; 19]). Первые спонтанные гепатомы у мышей-самцов возникают в период, близкий к 6-месячному возрасту, и встречаются в 7 раз чаще, чем у самок. В возрасте 18-22 мес в 100% случаев у самцов выявляют гепатокарциномы [17; 27].

Мыши контрольной группы ($n=90$) получали в качестве питья воду. Мышам опытной группы ($n=80$) 10 %-ный раствор МФА добавляли в воду, которую получали самки, начиная с момента рождения и до отъема детенышей в возрасте 1 мес постнатального развития. Всего в работе использовано 170 мышей.

Часть животных (13–30 мышей из каждой группы) забивали (с использованием эфирного наркоза) в возрасте 4; 8; 22 мес. Печень контрольных и опытных животных, помимо макроскопического исследования, подвергали гистологической обработке по стандартной методике и окрашиванию гематоксилином и эозином.

МФА представляет собой препарат на основе компонентов экстрактов сорока растений, включенных в Госфармакопею РФ [5; 6], в том числе – известных адаптогенов женьшеня (*Panax L.*), родиолы розовой (*Rhodiola rosea L.*), элеутерококка (*Eleutherococcus M.*), лимонника (*Schisandra coccinea*), заманихи (*Oplopanax elatus*) и аралии (*Aralia racemosa L.*).

Разработаны способы биологической и химической стандартизации [7; 20; 21; 22]. В предыдущих исследованиях выявлены антиоксидантное, антимуtagenное, противоопухолевое, радиопротекторное, нейропротекторное, иммуномодулирующее, в том числе – противовоспалительное и интерфероногенное, действия МФА [2; 8–10; 14–16; 18].

Результаты и обсуждение

В возрасте 4 мес. у мышей контрольной и опытной групп опухоли обнаружены не были.

На рис. 1 в качестве примера представлен срез ткани печени самца контрольной группы в возрасте 4 мес. Обычные гепатоциты с нормальными ядрами и цитоплазмой образуют печёчные балки, характерные для нормальной ткани органа. Виден также срез сосуда с эритроцитами внутри просвета. Микроскопическое строение ткани печени опытных животных в этом же возрасте было аналогичным.

На рис. 2 показан срез ткани печени животного контрольной группы в возрасте 8 мес, который также демонстрирует нормальное строение: рисунок печеночных балок, просвет кровеносного сосуда, наличие желчных капилляров.

Между тем известно, что у высококоракых самцов линии *СВА* первые опухоли в печени возникают в период, близкий к шестимесячному возрасту [17]. В нашем эксперименте в контрольной группе мышей в возрасте 8 мес макроскопически и микроскопически мы наблюдали опухоли у 10 % исследованных животных.

На рис. 3 продемонстрирован гистологический препарат с гепатокарциномой контрольного животного в возрасте 8 мес. Вокруг просвета кровеносного сосуда видны полиморфные опухолевые клетки, образующие тяжи (трабекулы), практически лишь отдалённо похожие на структуры печеночных балок. В данном случае опухоль можно оценить как трабекулярную гепатокарциному умеренной дифференцировки. У животных опытной группы, принимавших МФА, мы не наблюдали признаков опухолевого процесса в этом возрасте.

В позднем онтогенезе (в возрасте 22 мес) у всех мышей контрольной группы были выявлены гепатокарциномы. На рис. 4 представлен гистологический препарат спонтанной гепатокарциномы самца линии *СВА* контрольной группы. В данном случае на препарате видны полиморфные опухолевые клетки с гиперхромными ядрами, расположенные в виде трабекул и характерных атипичных полостей (ацинусов). Увеличено соотношение «ядро-цитоплазма». В синусоидах между трабекулами и просветах ацинусов отмечаются эритроциты, муцинозное вещество или желчный пигмент. По своему строению наблюдаемая ткань далека от нормального морфологического строения печени. В данном случае наблюдается низкодифференцированная трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома, т.е. опухоль смешанного строения.

У мышей опытной группы, получавших МФА в течение первого месяца постнатального онтогенеза, гепатокарциномы были выявлены в 69,2 % случаев. В качестве примера на рис. 5 представлен гистологический препарат опухоли в этом возрасте (в данном случае, судя по однородным крупным клеточным ядрам, гепатокарцинома инфильтрирована массой активированных лимфоцитов; в соседних участках и по периферии опухоли также видны отдельные лимфоциты и их группы; наблюдаются также деструктивные элементы клеток опухоли).

У животных контрольной группы лимфоцитарной инфильтрации в опухолях не наблюдали. При этом были выявлены сниженная экспрессия лейкоцитарных интегринов, высокая частота возникновения опухолей, существенное их количество и размеры.

Следует отметить, что миграция и накопление активированных лимфоцитов в опухолевом очаге служит положительным прогностическим признаком опухолевого процесса [9].

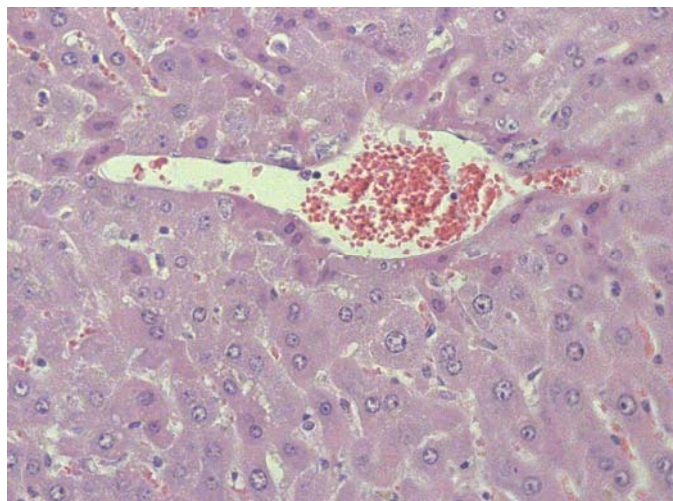


Рис. 1. Самец линии СВА 4 мес., контрольная группа; ткань печени, окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$.

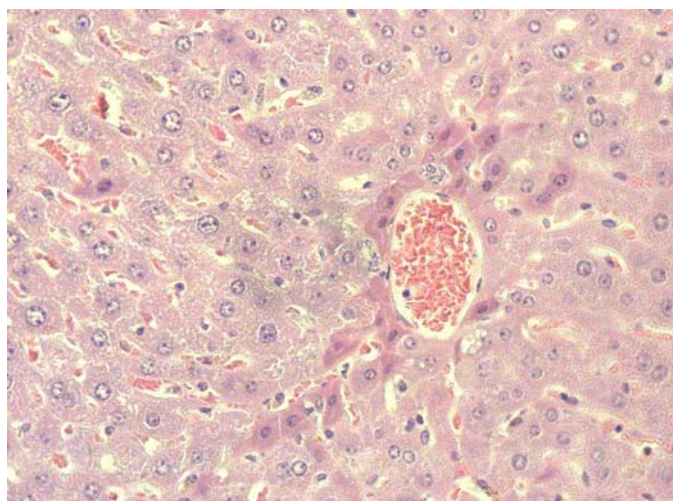


Рис. 2. Самец линии СВА 8 мес., контрольная группа; ткань печени, окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$.

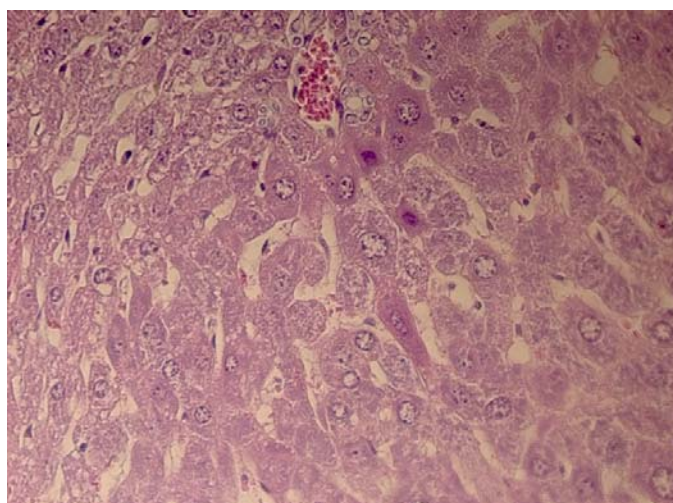


Рис. 3. Самец линии СВА 4 мес., ткань печени, трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома низкой дифференцировки, окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$.

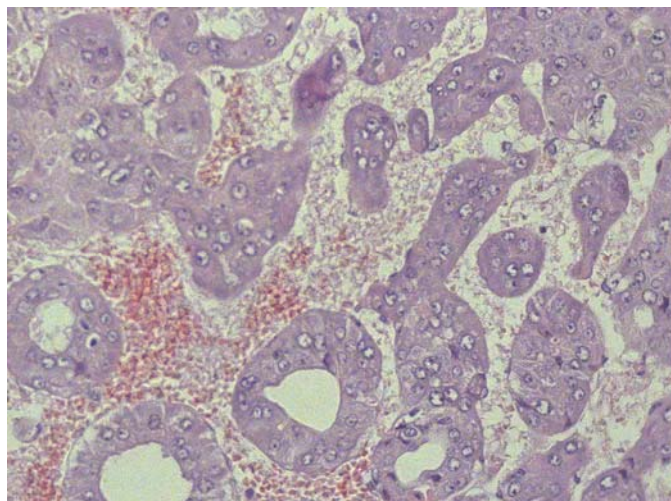


Рис. 4. Трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома низкой дифференцировки. Самец линии мышей СВА контрольной группы 22 мес; окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$.

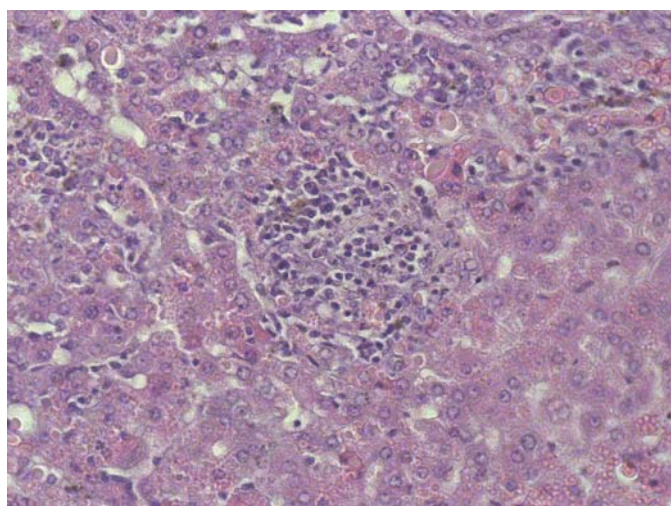


Рис. 5. Трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома низкой дифференцировки. Самец линии мышей СВА в возрасте 22 мес, получавший фитомикс-40 в течение 1-го месяца жизни; окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$.

Клеточные эффекторы иммунитета (активированные лимфоциты, нейтрофилы, NK-клетки) контактируют с клетками-мишенями, что может выступать критическим фактором, который приводит в конечном итоге к гибели опухолевых клеток [1; 23; 24; 26]. Такой контакт может быть обусловлен усилением на эффекторах иммунитета экспрессии молекул адгезии, в том числе лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1. Экспрессия последних может быть индуцирована их лигандами (например, ICAM-1, -2) на клетках-мишенях с помощью регуляторных реакций при участии цитокинов (ИЛ-6, -10, 12, ИФН- γ , ФНО и др.; [25]). Морфологическая картина опухолевых очагов в результате воздействия МФА в раннем онтогенезе в течение первого месяца постнатального развития сочеталась с долговременным повышением экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках крови, снижением сывороточного содержания ИЛ-6 и ИЛ-10, частоты опухолеобразования, а также уменьшением размеров опухолей у мышей опытной группы.

Заключение

Введение нетоксичного, неканцерогенного препарата мультифитоадаптогена с адгезиогенным действием высокоракковым мышам в течение первого месяца постнатального развития, захватывая завершающий период дифференцировки нормальной ткани печени, приводит к долговременному усилению экспрессии молекул гетеротипической адгезии лейкоцитарных интегринов LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18), обеспечивающих контактные взаимодействия иммунных эффекторов и клеток-мишеней в опухолевых узлах.

Инфильтрация спонтанных гепатокарцином активированными лимфоцитами может способствовать повышению активности противоопухолевых реакций иммунитета и деструкции опухолевой ткани. В результате снижена частота возникновения, количества и размеров наследственных опухолей.

Литература

1. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник московского онкологического общества. – 2008. – № 1. – С. 6–10.
2. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Казеев И.В. и др. Исследование радиозащитной активности мультифитоадаптогена в эксперименте на мышах // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. – № 3. – С. 55–8.
3. Бочарова О.А., Модянова Е.А., Ушаков В.Ф. Механические свойства межклеточных контактов гепатоцитов у мышей инбредных линий и предрасположенность к спонтанным гепатомам // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1980. – Т. 89, № 4. – С. 459–62.
4. Бочарова О.А., Модянова Е.А. Изменение межклеточных контактов гепатоцитов в онкогенезе у мышей инбредных линий с высокой (СВА) и низкой (С57В1) частотой спонтанных гепатом // Онтогенез. – 1982. – Т. 13, № 4. – С. 427–9.
5. Бочарова О.А. Патент РФ № 2099410. Композиция ингредиентов для бальзама Алексеевой (Фитомикс-40). 1998. – Бюлл. № 35.
6. Бочарова О.А., Лыженкова М.А., Мезенцева М.В. и др. Фитоадаптоген для профилактической онкологии: иммунобиологические критерии состава. // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2003. – Т. 136, № 12. – С. 670–3.
7. Бочарова О.А., Лыженкова М.А., Куренная О.Н., Княжев В.А. Способ биологического контроля комплексного фитоадаптогена // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2003. – Т. 136, № 12. – С. 694–9.
8. Бочарова О.А., Барышников А.Ю. Фитоадаптогены в онкологии. – М.: ЗооМедВет, 2004. – 138 с.
9. Бочарова О.А., Давыдов М.И., Клименков А.А. и др. Перспективы применения фитоадаптогена в лечении распространенного рака желудка // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2009. – Т. 148, № 7. – С. 96–9.
10. Бочарова О.А., Давыдов М.И., Барышников А.Ю. и др. Комплексные фитоадаптогены в онкологии и геронтологии // Вестник РАМН. – 2009. – № 8. – С. 21–5.
11. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А. и др. Лейкоцитарные интегрин при гепатоканцерогенезе мышей высококорактовой линии СВА // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 53–6.
12. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.В. и др. LFA-1, Mac-1 интегрин и IL-6, -10 цитокины у высококорактовых мышей под воздействием фитоадаптогена // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2014. – Т. 157, № 2. – С. 223–6.
13. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.В. и др. Снижение возникновения гепатом при воздействии фитоадаптогена у высококорактовых мышей СВА // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 73–6.
14. Бочков Н.П., Бочарова О.А., Аксенов А.А. и др. Частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы // Медицинская генетика. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 15–9.
15. Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Казеев И.В. и др. Радиозащитная эффективность мультифитоадаптогена в опытах на собаках // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. – № 4. – С. 51–4.
16. Куренная О.Н., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромицетов // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 12. – С. 1364–9.

17. Медведев Н.Н. Линейные мыши. – Л.: Медицина, 1964. – 230 с.
18. Пожарицкая М.М., Бочарова О.А., Чекалина Т.Л., Воронин В.Ф. Современные аспекты патогенеза и лечения лейкоплакии слизистой оболочки полости рта. Методическое руководство для врачей. – М.: ГОУ ВУНМЦ, 2004. – 46 с.
19. Фактор В.М., Шипова Л.Я. и др. Уровень клеточной ДНК в спонтанных гепатомах мышей линии СВА. Cell DNA of CBA mouse strain spontaneous hepatomas // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1984. – Т. 97, №6. – С. 710–3.
20. Шейченко В.И., Бочарова О.А., Шейченко О.П. и др. Аналитические возможности метода ЯМР для определения компонентов препарата Фитомикс- 40 // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2006. – Т. 72, № 8. – С. 15–23.
21. Шейченко О. П., Бочарова О. А., Шейченко В. И. и др. Возможности использования электронных спектров поглощения для стандартизации многокомпонентного препарата «Фитомикс-40» // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2007. – № 2. – С. 20–5.
22. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ // Вопр. биол. мед. фарм. химии. – 2012. – № 10. – С. 52–9.
23. Chiou S.H., Sheu B.C., Chang W.C. et al. Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies // Reprod Immunol. – 2005. – 67(1–2). – P. 35–50.
24. 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). – P. 286–93.
25. 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). – P. 245–51.
26. Sasada T., Suekane S. Variation of tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers: controversy on clinical significance // Immunotherapy. – 2011. – 3(10). – P. 1235–51.
27. Sharp J., Riches A., Littlewood V., Thomas D. The incidence, pathology and transplantation of hepatomas in CBA mice // J Pathol. – 1976. – 119(4). – P. 211–20.