

ДИНАМИКА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНОЧНОЙ ДОЛЬКИ КРЫС С КАРЦИНОСАРКОМОЙ WALKER 256

Татьяна Анатольевна КУНЦ, Анатолий Васильевич ЕФРЕМОВ,
Елена Владимировна ОВСЯНКО, Мария Геннадьевна ПУСТОВЕТОВА

ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

Проведено исследование морфометрических показателей сосудистой системы печени крыс Wistar в динамике развития перевивной карциносаркомы Walker 256. Выявлены реактивные изменения стромы токсического и обструктивного генеза: преимущественно лимфоцитарная инфильтрация с формированием агрегатов, стойкая дилатация центральных и поддольковых вен, мозаичность кровенаполнения синусоидов. Возрастное структурной плотности лимфатических пространств Малла прямо коррелировало с обтурационными изменениями сосудов портальных трактов и синусоидов. Обнаружена метастатическая инвазия карциносаркомы Walker 256 по гематогенному пути с образованием внутридольковых метастазов. На ранних стадиях развития опухоли отмечена активация цитотоксической функции печени с некрозом опухолевых очагов.

Ключевые слова: печень, карциносаркома Walker 256, сосудистая система, прелимфатики, метастазы.

Опухолевый процесс сопровождается развитием паранеопластического синдрома, обусловленного факторами неспецифической эндогенной интоксикации с выделением токсических продуктов, оказывающих повреждающее действие на органы и ткани [3]. В результате опухолевого распада с высвобождением цитокинов и факторов лизиса токсические субстанции распространяются в организме, благодаря системе циркуляции крови и межорганному гуморальному связям [7, 10, 13]. Выброс опухолевыми клетками различных факторов свертывания крови приводит к активации коагуляционного каскада через сосудисто-тромбоцитарное звено гемостаза и выражается в повышенном образовании фибриногена, нарушении реологических свойств крови [6, 9], что определяет большое количество тромбозов и тромбоэмболических осложнений, сопутствующих опухолевому росту [17].

При длительном воздействии факторов паранеопластической интоксикации при прогрессировании опухоли запускаются адаптационные гормональные реакции, увеличивается внеклеточное жидкостное пространство, возрастает функциональное напряжение органов детоксикации, в том

числе печени [11, 18, 19]. Система кровообращения печени, как и в любом другом органе, является ключевой в формировании патологии полифункционального характера [20]. Сосудистое русло печени участвует в координировании метаболических процессов, в частности, эндотелий синусоидов на клеточном уровне осуществляет основную функцию микроциркуляторной системы – транскапиллярный обмен, снабжение клеток питательными и пластическими веществами и удаление отработанных продуктов. Именно через стенки сосудов осуществляется процесс массопереноса и перемещение интерстициальной жидкости [2, 16]. Компоненты крови, проникая в субэндотелиальное пространство и подвергаясь окислению, взаимодействуют с эндотелиальной поверхностью [9, 15, 20]. Поскольку эндотелиальная выстилка сосудов печени обеспечивает сосудистый тонус и миграцию клеток крови через сосудистую стенку, при дисфункции эндотелия наблюдается дисбаланс между факторами, регулирующими эти процессы [12, 14], что может приводить к нарушению гемореологии и гемостаза в органе [9, 15, 20]. Патологический процесс в печени может формироваться в силу ослабления

Кунц Т.А. – к.б.н., научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории,
e-mail: tkunts@ngs.ru

Ефремов А.В. – д.м.н., проф., член-кор. РАМН, зав. кафедрой патофизиологии,
заслуженный деятель науки РФ

Овсянко Е.В. – д.м.н., доцент кафедры анатомии человека педиатрического факультета

Пустоветова М.Г. – д.м.н., проф., зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией

адаптивных способностей клеточных элементов стромы и паренхимы, затрагивая различные звенья системы кровообращения органа. В связи с этим чрезвычайную актуальность приобретает проблема изучения особенностей реагирования сосудистого русла печени в динамике на фоне развития опухолевого процесса.

Целью настоящего исследования является изучение параметров сосудистого русла печени в динамике на фоне «естественного» развития карциносаркомы Walker 256.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Крысам-самцам Wistar массой 180–200 г в мышцу бедра осуществляли трансплантацию 106 клеток карциносаркомы Walker 256 (W256) [8]. Образцы печени для исследования забирали спустя 3, 5, 7 и 14 суток после перевивки опухоли. В качестве контроля использовали интактных крыс. Все манипуляции с лабораторными животными проводились с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Образцы печени фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина при комнатной температуре, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в смесь воска и парафина. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Светооптическое исследование и морфометрический анализ проводили в микроскопах Micros MS300A (Австрия) и Micromed (Россия). Микрофотографирование осуществляли с помощью цифровой камеры Ваumer optronic CX13с, измерения объектов проводили с помощью программ ВидеоТест-Морфология (Россия) и Image J 1.42q (НИН, США).

При помощи окулярной морфометрической сетки, состоящей из 25 тестовых точек и 5 линий [1], на тестовой площади ($6,4 \times 10^4$ мкм²) при увеличении в 1000 раз определяли объемную

плотность (V_v) синусоидных капилляров. С помощью окуляр-микрометра измеряли диаметр (D) поддольковых и центральных вен, а также междольковых артерий, вен и желчных протоков, вычисляли площадь лимфатических пространств Малла в зоне триад (по 48 измерений каждого параметра с группы). Интенсивность процесса метастазирования в печени оценивали по площади метастазов ($S_{мет}$) и частоте метастазирования (ЧМ).

Статистическая обработка результатов заключалась в подсчете средних величин (M) и их стандартных ошибок (m). Достоверность различий оценивали с использованием U-критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферони при 95 % уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через трое суток после имплантации клеток карциносаркомы W256 морфологическая картина была представлена умеренными изменениями микроциркуляции, свидетельствующими о нарушении кровообращения. Явления застоя крови были характерны для центральных и междольковых вен, выявлялось неравномерное расширение синусоидов (см. таблицу). На повышенную гидратацию интерстиция в области триад указывало увеличение площади лимфатических пространств Малла (в 2,1 раза по сравнению с интактными животными, $p < 0,05$). Лимфатические пространства Малла нередко содержали лимфоидные элементы, которые в виде мелких инфильтратов были видны и в паренхиме долек печени как признак повышения проницаемости микрососудов.

Через 5 суток развития карциносаркомы W256 отмечались более выраженные изменения, свидетельствующие о нарушении кровообращения: полнокровие междольковых, изредка центральных вен. Участки расширения просветов капиллярного русла чередовались с участками их

Таблица

Морфометрические данные сосудистого русла печени крыс с карциносаркомой W256, $M \pm t$

Структура	Контроль	Время после имплантации клеток карциносаркомы W256			
		3 сут	5 сут	7 сут	14 сут
Синусоидные капилляры	0,13 ± 0,01	0,23 ± 0,01*	0,21 ± 0,01*	0,22 ± 0,01*	0,20 ± 0,01*^
Поддольковые вены	85,25 ± 2,46	91,63 ± 2,14	92,55 ± 1,58*	93,23 ± 2,23*	97,31 ± 2,32*
Центральные вены	82,71 ± 2,19	82,47 ± 2,36	92,60 ± 2,48*	93,02 ± 2,05*	96,85 ± 1,98*
Междольковые вены	70,51 ± 2,20	72,86 ± 2,33	72,96 ± 1,92	70,64 ± 1,94	73,05 ± 2,43
Междольковые артерии	59,03 ± 1,69	69,81 ± 2,39*	70,15 ± 2,23*	62,63 ± 1,74^	57,45 ± 1,80^

Примечание. Здесь и на рисунке обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – контроля, ^ – предыдущего срока.

сужения и выраженного торможения кровотока за счет обструкции капилляров сладжированными эритроцитами. Гепатоциты имели округлые контуры ядер, содержащих одно или два ядрышка. Отмечалось появление очагов дистрофии и некроза гепатоцитов. Клеточная инфильтрация, преимущественно лимфоцитарная, локализовалась в портальных трактах, междольковых перегородках; иногда в зонах мелких некротических фокусов формировались лимфоидные скопления. В перипортальных зонах печеночных долек имело место увеличение площади пространств Малла (в 2 раза по сравнению с контролем, $p < 0,05$), иногда выявлялись тучные клетки.

Через 7 суток развития карциносаркомы W256 в печени периферически и отчасти центрально-лобулярно имела место агрегация эритроцитов, тромбоцитов и гранулоцитов, способствовавшая закупорке части капилляров и их расширению. В результате замедления кровотока в синусоидах и снижения оксигенации и трофики гепатоцитов часть их была дистрофически изменена, в другой части, в зонах фокальных некрозов, располагавшихся, как правило, вблизи центральных вен, ядра клеток паренхимы имели признаки пикноза, кариолизиса и кариорексиса. Дилатация центральных и поддольковых вен печени (см. таблицу) сопровождалась расширением вокруг них лимфатических коллекторов как свидетельство застойных явлений и нарушения оттока крови из органа. По расширенным тканевым щелям и лимфатическим сосудам происходила интенсивная миграция лимфоидных элементов в другие компартменты печеночных долек, площадь пространств Малла превышала контрольное значение в 1,8 раза. Как и в группе на 5-е сутки роста карциносаркомы W256, через 7 суток в зонах сосудов портальных трактов отмечались скопления клеток лимфоидного ряда, часто с образованием лимфоидных агрегатов.

На 14-е сутки после имплантации клеток карциносаркомы W256 усугублялись признаки нарушения крово- и лимфообращения в печени, проявляющиеся эритроцитарным сладжем в синусоидах, дилатацией и полнокровием центральных и поддольковых вен, сопровождающимися плазморрагиями и иногда геморрагиями. Наблюдалось увеличение площади лимфатических пространств Малла в 1,4 раза по сравнению с интактными животными.

На всех экспериментальных сроках развития опухоли имело место метастатическое поражение печени в виде одиночных опухолевых клеток на ранних сроках и их конгломератов на более поздних сроках. Опухолевые клетки, в соответствии с гематолимфогенным путем распростра-

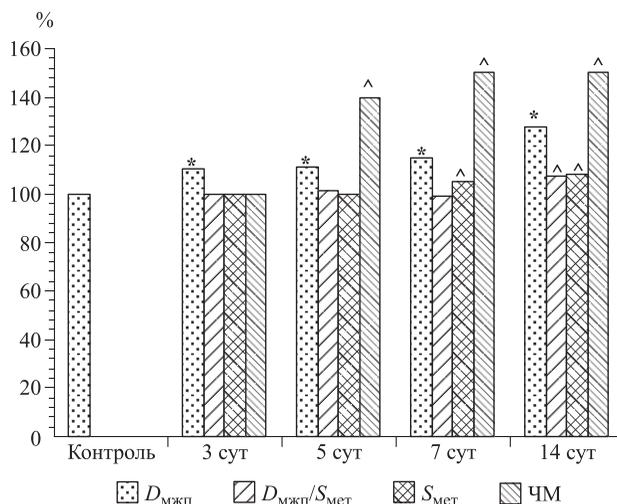


Рис. Корреляция параметров метастатической инвазии с диаметром холангиол крыс Wistar с карциносаркомой W256. $D_{mjп}$ – диаметр междольковых желчных протоков; $S_{мет}$ – площадь метастазов, ЧМ – частота метастазирования

нения карциносаркомы W256, обнаруживались в зоне портальных трактов, а затем мигрировали по синусоидам в паренхиме, образуя внутривидольковые метастазы. Увеличение диаметра холангиол, отражающее холестатическое поражение печени, прямо коррелировало с площадью метастазов (см. рисунок). На 5-е и 7-е сутки спонтанного роста карциносаркомы W256 в печени обнаружена естественная цитотоксическая активность клеток: клеточные инфильтраты, содержащие лимфоциты, макрофаги, моноциты, эозинофилы, нейтрофилы, тучные клетки, которые перемещались в области некроза гепатоцитов и скоплений опухолевых клеток, осуществляя их лизис.

Выявленные гемодинамические изменения, сопровождающие развитие карциносаркомы W256, наблюдались на всех исследуемых сроках эксперимента. Неравномерное расширение синусоидных капилляров, обнаруживаемое уже через 3 суток после трансплантации опухолевых клеток, могло являться проявлением адаптивных реакций печени на нарушения микроциркуляции. По некоторым данным, эндотелиальные клетки капилляров, не обладая специфической сократительной функцией, в определенных условиях способны сокращаться. Изменение просвета капилляров может объясняться и пассивным механизмом, обусловленным разностью гидростатического давления внутри капилляра и окружающей ткани. В условиях патологии при появлении эритроцитарных агрегатов, закупоривающих отдельные капилляры, возрастает число капилляров, заполненных плазмой, которые при усиленной работе органа заполняются эритро-

цитами, кроме того, увеличивается число микрососудов [5]. Считается, что процесс агрегации эритроцитов обратим при восстановлении гемодинамических параметров. Накапливающиеся продукты метаболизма снижают тонус гладкомышечных клеток, вызывая дилатацию.

На более поздних стадиях развития опухоли в дополнение к нарушению сосудодвигательной функции ухудшение кровотока могло быть вызвано и воспалительными реакциями в печени, способствующими изменениям вязкости крови, создавшимися прокоагулянтными условиями [15], адгезией лейкоцитов к эндотелию [4] и увеличением сопротивления сосудов [6]. Известно, что особая роль в изменении реактивности сосудистой стенки принадлежит опухолевым цитокинам, в частности фактору некроза опухоли, который инициирует значительные морфологические изменения в цитоскелете эндотелиальных клеток, подавляя их пролиферативную активность, что *in vivo* проявляется повреждением эндотелия [9, 14]. Таким образом, патологический процесс постепенно приводил к истощению антиагрегационных, антикоагулянтных и фибринолитических возможностей эндотелия.

Расширение лимфатических пространств Малла в группах на 3-е и 5-е сутки после инокуляции карциносаркомы W256 могло свидетельствовать о сдвиге гематолимфатического равновесия, разбалансировке корней лимфатической системы и интенсификации процессов лимфатического дренажа с целью дезинтоксикации. На 7-е и 14-е сутки роста опухоли наблюдалось снижение площади пространств Малла вследствие ослабления дренажно-детоксикационной функции лимфатической системы, что могло приводить к развитию лимфотоксикоза и накоплению интерстициальной жидкости с высоким содержанием токсичных продуктов, обуславливая повреждение клеточных структур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инокуляция карциносаркомы Walker 256 крысам Wistar приводила к опухолевому поражению печени токсического и обструктивного генеза. Изменения динамических морфометрических показателей сосудистой системы печеночной доли были обусловлены нарастающими обтурационными и тромботическими поражениями микрососудов с развитием геморрагий на 14-е сутки после введения опухолевой культуры. Возрастание площади лимфатических пространств Малла отражало увеличение емкости тканевых пространств и прямо коррелировало с застойными явлениями в сосудах портальных трактов

и синусоидах. Реактивные изменения стромы выражались преимущественно лимфоцитарной инфильтрацией с формированием агрегатов. Обнаружена метастатическая инвазия карциносаркомы Walker 256 по гематогенному пути с образованием внутридольковых метастазов, на ранних стадиях развития опухоли выявлен некроз опухолевых очагов вследствие активации цитотоксической функции печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
2. Бородин Ю.И., Мичурин С.В. Лимфатический регион печени как маркер экологического прессинга на организм // Морфология. 1998. 113. (3). 25–28.
3. Ганцев Ш.Х. Онкология. М., 2004. 516 с.
4. Жерносеков Д.Д. Адгезивные белки в процессе воспаления // Біополімери і клітіна. 2007. 23. (6). 483–488.
5. Литасова Е.Е. Взаимосвязь и взаимообусловленность функционирования систем организма человека как единой информационной системы с позиции саморегуляции через систему кровообращения (введение в проблему). Новосибирск, 2011. 103 с.
6. Плотников М.Б., Маслов М., Алиев О.И. и др. Нарушения реологических свойств крови у крыс с карциносаркомой 256 Уокер и при химиотерапии циклофосфаном // Вопр. онкологии. 2001. 47. (3). 335–337.
7. Семенова А.И. Гиперкальциемия и синдром распада опухоли // Практич. онкология. 2006. 7. (2). 101–107.
8. Хегай И.И., Попова Н.А., Иванова Л.Н. Влияние экспрессии гена вазопрессина на рост карциносаркомы Walker 256 у крыс // Генетика. 2000. 42. (7). 993–995.
9. Bacurau R.F., O'Toole C.E., Newsholme P. et al. Sub-lethal concentrations of activated complement increase rat lymphocyte glutamine utilization and oxidation while lethal concentrations cause death by a mechanism involving ATP depletion // Cell Biochem. Funct. 2002. 20. 183–190.
10. Baeksgaard L., Sorensen J.B. Acute tumor lysis syndrome in solid tumors – a case report and review of the literature // Cancer Chemother. Pharmacol. 2003. 51. 187–192.
11. Finora K. Common paraneoplastic syndromes // Clin. Tech. Small Anim. Pract. 2003. 18. 123–126.
12. Lefter A.M., Ma X.L. Cytokines and growth factors in endothelial dysfunction // Crit. Care Med. 1993. 21. S9–S14.
13. Lovelace K., Vangessel Y., Asher L.V. et al. Spontaneous acute tumor lysis syndrome in a DBA/1J

mouse: a case report and review // *Toxicol. Pathol.* 2003. 31. 486–490.

14. Madge L.A., Pober J.S. TNF signaling in vascular endothelial cells // *Exp. Mol. Pathol.* 2001. 70. 317–325.

15. Menger M.D., Richter S., Yamauchi J. et al. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury // *Hepatogastroenterology.* 1999. 46 (2). 1452–1457.

16. Niiro G.K., O'Morchoe C.C.C. Pattern and distribution of intrahepatic lymph vessels in the rat // *Anat. Rec.* 1986. 215. 351–360.

17. Racanelli V., Prete M., Minoia C. et al. Rheumatic disorders as paraneoplastic syndromes // *Autoimmun. Rev.* 2008. 7. 352–358.

18. Spiro S.G., Gould M.K. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes // *Chest.* 2007. 132. 149S–160S.

19. Tisdale M.J. Mechanisms of cancer cachexia // *Physiol. Rev.* 2009. 89. 381–410.

20. Vollmar B., Menger M.D. The Hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair // *Physiol. Rev.* 2009. 89. 1269–1339.

DYNAMICS OF MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF LIVER LOBULE VASCULAR SYSTEM IN WALKER 256-BEARING RATS WITH CARCINOSARCOMA

Tatyana Anatolyevna KUNTS, Anatoly Vasilyevich EFREMOV, Elena Vladimirovna OVSYANKO, Marya Gennadyevna PUSTOVETOVA

*Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny av., 52*

Morphometric characteristics of the liver vascular system in dynamics were investigated in Wistar rats transplanted with Walker carcinosarcoma 256. Reactive stromal changes revealed have toxic and obstructive genesis: lymphocytic infiltration with aggregates formation, persistent dilatation of the central and sublobular veins, irregular blood filling in the sinusoids. Structural density increase of lymphatic spaces of Mall directly correlated with obstructive vascular changes in triads and sinusoids. Metastatic invasion of carcinosarcoma Walker 256 cells was detected by blood-lymph way of spreading and intralobular node metastases were formed. In the early stages of tumor growth the cytotoxic liver activity, necrosis of the tumor foci were found out.

Key words: liver, carcinosarcoma Walker 256, vascular system, prelymphatics, metastases.

Kunts T.A. – candidate of biological sciences, researcher of central research laboratory

Efremov A.V. – doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAMN, head of the chair for pathophysiology, honored scientist of the RF

Ovsyanko E.V. – doctor of medical sciences, associated professor of the chair for human anatomy

Pustovetova M.G. – doctor of medical sciences, professor, head of central research laboratory