

© ТАВЛУЕВА Е.В.

УДК 616.132.2-008.64-08

## ГЕНДЕРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В СОДЕРЖАНИИ НЕОПТЕРИНА У ПАЦИЕНТОВ С ИНФАРКТОМ МИОКАРДА И ПОДЪЕМОМ СЕГМЕНТА ST

Е.В. Тавлуева

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН,  
Кемерово, директор – акад. РАМН Л.С. Барбараш.

**Резюме.** Достоверных различий уровня неоптерина, оцененного на 10-14-е сутки ИМ, у женщин и мужчин выявлено не было. Как у женщин, так и у мужчин с инфарктом миокарда в возрасте старше 66 лет концентрация неоптерина выше, чем у пациентов до 66 лет. У мужчин с неблагоприятным прогнозом уровень неоптерина, оцененный в конце госпитального периода, был достоверно выше, по сравнению с пациентами с благоприятным прогнозом ( $p=0,0001$ ). Наиболее высокая концентрация изучаемого биомаркера была характерна для мужчин старшей возрастной группы с неблагоприятным годовым прогнозом, по сравнению с мужчинами до 66 лет с неблагоприятным прогнозом ( $p=0,0286$ ). Подобных различий в группе обследованных женщин выявлено не было.

**Ключевые слова:** инфаркт миокарда, гендерные различия, неоптерин.

Тавлуева Евгения Валерьевна – к.м.н. ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии мультифокального атеросклероза, НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, Кемерово; e-mail: [tavlev@cardio.kem.ru](mailto:tavlev@cardio.kem.ru).

В последние годы получены доказательства важной роли воспаления в

возникновении атеросклероза и его клинических проявлений. Развитие инфаркта миокарда (ИМ) влечет за собой возникновение системной и локальной воспалительной реакции, активации острофазовых белков, в частности, компонентов системы комплемента, С - реактивного белка (СРБ), орозомукоида, калликреина, кининов. В плазме крови пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) выявляются также неспецифические маркеры воспаления – интерлейкины (IL) - 1,4,6,10, фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), фибриноген [11]. Существуют данные, что воспалительная реакция у женщин более выражена. Изменения липидного спектра и активация воспалительного процесса развиваются у них в среднем за 2-3 года до наступления менопаузы и, возможно сохраняют свою роль в прогрессировании ИБС [2].

Активно ведется поиск новых информативных биологических маркеров, оценка которых позволит, с одной стороны, уточнить механизмы прогрессирования атеросклероза, с другой, повысить эффективность прогнозирования течения заболевания. Появились первые исследования роли неоптерина в развитии и прогрессировании атеросклероза [10].

Неоптерин является промежуточным продуктом в синтезе биоптерина, участвующего в активации лимфоцитов. Концентрация неоптерина в плазме крови отражает совместное действие различных цитокинов на популяцию моноцитов/макрофагов, стимулированных гамма-интерфероном. Неоптерин как интегральный маркер активации клеточного иммунитета имеет особое значение при хронических воспалительных заболеваниях. В недавно завершеном исследовании LURIC (Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health) было доказано, что неоптерин является независимым предиктором сердечно-сосудистых событий и сердечно-сосудистой смертности у пациентов как с ИБС, так и без нее [8].

Целью настоящего исследования явилась оценка активности неоптерина у больных ИМ с подъемом сегмента ST в позднем госпитальном периоде в зависимости от гендерных особенностей.

## Материалы и методы

В рамках регистра острого коронарного синдрома (ОКС) с подъемом сегмента ST, проведенного на базе Кемеровского кардиологического диспансера в период с 1 января 2008 года по 31 декабря 2008 года, поступавших в стационар с диагнозом ИМ с подъемом сегмента ST. Дизайн регистра ОКС был подробно описан ранее [1]. Критериями включения пациентов в регистр служили наличие на первичной записи электрокардиограммы (ЭКГ) элевации сегмента ST более 1,0 мм в двух смежных отведениях либо «новой» полной блокады левой ножки пучка Гиса (ЛНПГ); давность от момента заболевания не более 48 часов. Пациенты, подходящие для внесения в регистр, идентифицировались проспективно, что позволяло включать всех последовательно поступивших в клинику пациентов.

Критериями исключения явились ОКС, возникшие как осложнение чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) или операции коронарного шунтирования. Также исключались пациенты с клинически значимой сопутствующей патологией: хронической или острой почечной, печеночной недостаточностью, хронической обструктивной болезнью легких, бактериальной или вирусной инфекцией, аутоиммунными заболеваниями, заболеваниями щитовидной железы, надпочечников. Все пациенты, включенные в исследование, подписывали одобренную локальным этическим комитетом учреждения форму информированного согласия. В настоящее исследование включено 153 пациента; из них 118 (70,4%) – мужчины и 35 (29,6%) – женщины. Концентрацию сывороточного неоптерина оценивали на 10-14-е дни ИМ (твердофазным методом иммунно-ферментного анализа), с использованием реактивов фирмы IBL (Gamburg, Германия). Выбор сроков оценки биомаркеров определили исходя из того, что первые пять суток от развития ИМ являются периодом массивного острого воспалительного ответа с избыточной выработкой всех острофазовых факторов. К десятым суткам от развития ИМ остаются лишь «следовые потенциалы» воспаления. Таким образом, параметры, определяемые в эти сроки, могут косвенно отражать уровень

хронического воспалительного процесса, ответственного, возможно, за последующие неблагоприятные сердечно-сосудистые события.

При оценке признаков недостаточности кровообращения в острой стадии ИМ применяли классификацию Killip. При оценке уровня воспалительного ответа у мужчин и женщин каждая группа была рассмотрена в целом и в последующем разделена в зависимости от возраста (до 66 лет и 66 лет и старше). Также в исследовании оценивался комбинированный неблагоприятный прогноз (ККТ), к которому были отнесены возникшие в течение 12 месяцев от индексного события случаи повторного ИМ, острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК), повторные госпитализации в связи с нестабильной стенокардией (НС) или прогрессированием хронической сердечной недостаточности (ХСН), смерть.

Статистическую обработку полученных данных выполняли в системе статистического анализа Statistica (пакет прикладных программ Statistica фирмы StatSoft Inc., США, v. 6,0). Две независимые группы сравнивались с помощью U-критерия Манна-Уитни. Анализ различия частот в двух независимых группах проводился при помощи точного критерия Фишера, критерия Хи-квадрат с поправкой Йетса. Корреляционный анализ проводился методом ранговой корреляции Спирмена. Для всех проведенных анализов различия считались достоверными при двустороннем уровне значимости  $p < 0,05$ . Количественные признаки представлены в виде медианы с межквартильным интервалом.

### **Результаты и обсуждение**

Средний возраст женщин в настоящем исследовании составил  $61,3 \pm 7,5$  года; мужчин –  $57,3 \pm 8,8$  года ( $p = 0,0017$ ). Все женщины находились в постменопаузальном периоде. У женщин в анамнезе достоверно чаще (96,1%) встречалась артериальная гипертензия (АГ). Среди мужчин пациентов с АГ было 82,5% ( $p = 0,0148$ ). У женщин также чаще диагностировали сахарный диабет (СД): он был выявлен у 42,3% – женщин и только у 15,3% – мужчин,  $p = 0,0001$ . В настоящем исследовании не было выявлено различий в тяжести течения ИМ у женщин и мужчин. В обеих группах с одинаковой частотой

регистрировался передний ИМ (в 34,6% случаев у женщин и у 40,5% – мужчин,  $p=0,4517$ ); выполнялась реперфузионная терапия (в 82,6% случаев у женщин и в 74,8% – у мужчин,  $p=0,2489$ ). Обе группы не различались по степени выраженности острой сердечной недостаточности. Так, средний балл по Killip у женщин составил 1,26, у мужчин – 1,19,  $p=0,6075$ . Средний балл по шкале TIMI составил у женщин 2,92, у мужчин – 2,79,  $p=0,7730$ . Однако женщины и мужчины достоверно различались по уровню фракции выброса (ФВ) левого желудочка (ЛЖ), данный показатель составил 52,8% у женщин и 48,6% – у мужчин ( $p=0,007$ ).

Установлено, что достоверно чаще неблагоприятные сосудистые события возникали у женщин, чем у мужчин. Так, ККТ у женщин составила 45%, в то время как у мужчин – 28,1% ( $p=0,0014$ ). Однако достоверных различий по частоте развития каждой отдельной «конечной точки» у женщин и мужчин не было.

Достоверных различий уровня неоптерина, оцененного на 10-14-е сутки ИМ, у женщин и мужчин выявлено не было. Так, концентрация неоптерина у женщин составила 13,4 (7,0; 13,9) nmol/l, у мужчин – 11,9 (6,8; 12,0) nmol/l,  $p=0,8813$ . Однако, и у женщин, и у мужчин в старшей возрастной группе (66 и более лет) концентрация данного биологического маркера оказалась выше, чем у более молодых пациентов (рис. 1). Так, у пожилых женщин концентрация неоптерина оказалась более, чем в 2 раза выше, чем у молодых ( $p=0,0127$ ). У мужчин эти различия были также достоверны, однако менее выражены (концентрация у мужчин в возрасте 66 лет и старше была на 26% выше, чем у мужчин до 66 лет,  $p=0,0070$ ). Подобные результаты получили в своей работе и другие исследователи. Так, К. К. Ray с соавт. [14] у пациентов с ОКС выявили связь концентрации неоптерина с возрастом, наличием сахарного диабета и артериальной гипертензией, однако гендерных различий выявлено не было.

Разделив пациентов в зависимости от ККТ, выяснили, что у мужчин с неблагоприятным прогнозом уровень неоптерина, оцененный в конце госпитального периода, был достоверно выше – 17,4 (9,5; 20,9) nmol/l, по

сравнению с пациентами с благоприятным прогнозом – 10,8 (6,5; 10,9) nmol/l ( $p=0,0001$ ). Подобных различий в группе обследованных женщин выявлено не было.

При распределении пациентов по возрастным группам установлено, что концентрация неоптерина у мужчин была достоверно выше при неблагоприятном прогнозе по сравнению с благоприятным прогнозом как в возрасте до 66 лет, так и в возрасте 66 лет и старше. Наиболее высокая концентрация изучаемого биомаркера была характерна для мужчин старшей возрастной группы с неблагоприятным годовым прогнозом ( $p=0,0286$ ) (табл. 1). У женщин достоверных различий концентрации неоптерина, в зависимости от прогноза, выявлено не было как в возрасте до 66 лет, так и в возрасте 66 лет и старше. Однако в группе женщин с неблагоприятным прогнозом уровень неоптерина был достоверно выше в старшей возрастной группе по сравнению с более молодыми женщинами,  $p=0,0191$  (табл. 2).

Проведя сравнительный анализ взаимосвязи между концентрацией неоптерина и баллом по шкале TIMI, которая считается общепринятой для определения тяжести клинического течения ИМ, выявили положительную корреляционную связь между параметрами у мужчин ( $r=0,29$ ;  $p=0,0006$ ). Подобная взаимосвязь была выявлена у мужчин между уровнем неоптерина и степенью выраженности острой сердечной недостаточности при ИМ по шкале Killip ( $r=0,22$ ;  $p=0,0112$ ). Кроме того, была выявлена обратная корреляционная связь уровня неоптерина с показателем ФВ ( $r=-0,25$ ;  $p=0,0030$ ). У женщин подобных взаимосвязей выявлено не было. Р. Avanzas с соавт. в своем исследовании также выявили отрицательную корреляционную связь между ФВ левого желудочка и концентрацией неоптерина, однако анализ гендерных различий в указанном исследовании не проводился [5]. Таким образом, имеется тенденция к повышению концентрации неоптерина в плазме крови у мужчин с ИМ и дисфункцией ЛЖ.

Учитывая неоднородность исследуемых групп по значению ФВ (52,8% у женщин и 48,6% у мужчин,  $p=0,0070$ ) и выявленную значимую обратную

корреляционную связь между ФВ и концентрацией неоптерина, в дальнейшем были исключены из анализа пациенты с ФВ<35%. Характеристика группы женщин не изменилась. Из группы мужчин было исключено 13 пациентов. При этом число мужчин в группе составило 105 человек. При анализе вновь образованных групп достоверных различий средних величин ФВ у женщин и мужчин выявлено не было: данный показатель составил 52,8% у женщин и 50,7% – у мужчин ( $p=0,0831$ ). При распределении пациентов в зависимости от прогноза у мужчин сохранился достоверно более высокий уровень неоптерина в группе неблагоприятного прогноза, по сравнению с мужчинами с благоприятным прогнозом: 16,5 (9,5; 17,8) nmol/l и 9,5 (6,5; 10,2) nmol/l, соответственно ( $p=0,0014$ ). Наиболее высокое значение неоптерина также было выявлено у мужчин с неблагоприятным прогнозом в возрасте 66 лет и старше (табл. 1).

Повышенное содержание неоптерина в биологических жидкостях тесно ассоциировано с клеточной иммунной реакцией. При самых разных заболеваниях клеточная иммунная система вовлечена в патологический процесс, и концентрация неоптерина отражает прогрессирование заболевания. Острый коронарный синдром является классическим примером асептической воспалительной реакции, развивающейся вслед за развитием некроза. Согласно воспалительной теории атеросклероза, провоспалительные цитокины (IL-6, TNF- $\alpha$  и IL-18), способны усиливать как процессы локального воспаления в атеросклеротической бляшке, так и индуцировать системные эффекты, проявляющиеся в активации макрофагов в бляшках, расположенных в других участках коронарного русла или в других сосудистых областях [9, 12]. Данный факт может объяснить вероятность развития после перенесенного эпизода атеротромбоза острой сосудистой катастрофы как в коронарных, так и в других сосудистых бассейнах. Участие неоптерина в данном процессе подтверждается и другими исследователями. Так, D. Fuchs с соавторами показали, что повышенный уровень неоптерина является предиктором кардио-васкулярных событий у пациентов с ИБС [7]. F. Tatzber с соавт. доказывают, что

концентрация неоптерина тесно связана с прогрессированием атеросклероза в целом [15]. По данным ряда авторов, повышенный уровень неоптерина является маркером нестабильности атеросклеротической бляшки [4, 6]. Р. Avanzas с соавт. в своем исследовании показали, что высокая концентрация неоптерина является независимым предиктором смертности у пациентов даже с незначительными стенозами коронарных артерий [4,6,13]. Т. Adachi с соавт. предположили, что неоптерин сам является стимулом для развития воспаления и формирования нестабильности атеросклеротической бляшки [3].

Доказано, что при патологических состояниях человека, связанных с активацией клеточного иммунитета, концентрация неоптерина в крови может увеличиваться на 2–3 порядка. Клетками, ответственными за его избыточную продукцию, являются активированные моноциты/макрофаги. Продукция 7,8-дигидронеоптерина и неоптерина сопряжена с «оксидативным взрывом» моноцитов/макрофагов. В связи с этим необходимость в синтезе данных соединений может быть связана, с одной стороны, с самозащитой моноцитов/макрофагов от повреждающего действия активных форм кислорода (ROS). Так, 7,8-дигидронеоптерин, вступая в реакцию с активными радикалами, предотвращает их окислительное действие в отношении липидов, а главное, белков клеточной мембраны моноцитов/макрофагов. При этом 7,8-дигидронеоптерин окисляется до неоптерина. Неоптерин, ингибируя активность макрофагальных ферментов, генерирующих ROS, влияет на степень «оксидативного взрыва». С другой стороны, за счет прооксидантного эффекта, усиливаемого в присутствии ионов переходных металлов, неоптерин и 7,8-дигидронеоптерин способны потенцировать защитные эффекты, связанные с «оксидативным взрывом». В частности, прооксидантное действие данных птеринов играет роль в индукции экспрессии ряда генов, вовлеченных в реакции клеточного иммунитета – цитокинов, молекул адгезии и др. [9].

В настоящем исследовании показано, что концентрация в крови неоптерина достоверно более высока у мужчин с развитием неблагоприятных сосудистых событий. Данный факт, однако, противоречит данным литературы о более

выраженной воспалительной реакции у женщин и нашим собственным данным о менее благоприятном прогнозе у женщин в постинфарктном периоде. Таким образом, можно предположить, что пол является значимым фактором, определяющим воспалительную реакцию и прогноз у пациентов с ИМ.

Следовательно, полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о том, что активность воспалительных процессов может быть одним из механизмов развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у пациентов после перенесенного инфаркта миокарда. Однако, по всей видимости, у женщин и у мужчин данный процесс осуществляется с участием различных механизмов.

## **GENDER DIFFERENCES IN NEOPTERIN LEVEL IN PATIENTS WITH MYOCARDIAL INFARCTION AND ST- SEGMENT ELEVATION**

E.V. Tavlyueva

RAMS Institution State Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases

**Abstract.** Differences of neopterin rate on 10-14 days after MI were not revealed among male and female. Neopterin concentration is higher both in men and women in the age older then 66 years, then in patients before 66 years old. Neopterin rate was significantly higher in the end of hospital period in male with unfavorable prognosis ( $p=0,0001$ ). The highest rate of studied biomarker was in male from the old age group with unfavorable annual prognosis compare to male before 66 years old ( $p=0,0286$ ). Same differences were not revealed in female sample group.

**Key words:** myocardial infarction, gender differences, neopterin.

## **Литература**

1. Барбараш Л. С., Кашталап В.В., Зыков М.В. и др. Распространенность и клиническая значимость мультифокального

атеросклероза у пациентов с инфарктом миокарда и подъемом сегмента ST // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2010. – № 5. – Р. 31-36.

2. Манак Н.А., Барбук О.А. Взаимосвязь показателей дислипидемии и воспалительных маркеров атеросклероза у женщин со стабильной стенокардией // Клинич. медицина. – 2010. – №2. – С. 14-17.

3. Adachi T., Naruko T., Itoh A. et al. Neopterin is associated with plaque inflammation and destabilisation in human coronary atherosclerotic lesions // Heart. – 2007. – Vol. 93. – P. 1537–1541.

4. Avanzas P., Arroyo-Espliguero R., Cosin-Sales J. et al. Prognostic value of neopterin levels in treated patients with hypertension and chest pain but without obstructive coronary artery disease // Am. J. Cardiol. – 2004. – Vol. 93. – P. 627–629.

5. Avanzas P., Arroyo-Espliguero R., Quiles J. et al. Elevated serum neopterin predicts future adverse cardiac events in patients with chronic stable angina pectoris // Eur Heart J. – 2005. – Vol. 26. – P. 457-463.

6. Avanzas P., Arroyo-Espliguero R., Kaski J. C. Neopterin and Cardiovascular Disease: Growing Evidence for a Role in Patient Risk Stratification // Clinical Chemistry. – 2009. – Vol. 55, №6. – P. 1056-1057.

7. Fuchs D., Avanzas P., Arroyo-Espliguero R. et al. The role of neopterin in atherogenesis and cardiovascular risk assessment // Curr. Med. Chem. – 2009. – Vol.16. – P.4644-53.

8. Grammer T.B., Fuchs D, Boehm B.O. et al. Neopterin as a predictor of total and cardiovascular mortality in individuals undergoing angiography in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study // Clin. Chem. – 2009. – Vol. 55. – P. 1135-1146.

9. Garcia-Moll X., Coccolo F., Cole D. et al. Serum Neopterin and Complex Stenosis Morphology in Patients With Unstable Angina // J. Am. Coll. Cardiol.– 2000. – Vol. 35, № 4. – P. 1097-1099.

10. Kaski J.C., Avanzas P., Arroyo-Espliguero R. Neopterin: a forgotten

biomarker // J Am Coll Cardiol. – 2003. – Vol.42. – P.1140-1146.

11. Mazzone A., De Servi S., Vezzoli M. et al. Plasma levels of interleukin - 2, -6, -10 and phenotypic characterization of circulating T-lymphocytes in ischemic heart disease // Atherosclerosis. – 1999. – Vol. 145. – P. 369-374.

12. Moreau M., Brocheriou I., Petit L. Interleukin-8 mediates down-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase -1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerosis plaque // Circulation. – 1999. – Vol. 99. – P. 420-426.

13. Oliveira G.H. Novel serologic markers of cardiovascular risk // Current Atherosclerosis Reports. – 2005. – Vol. 7. – P. 88-95.

14. Ray K.K., Morrow D.A., Sabatine M.S. et al. Long-term prognostic value of neopterin: a novel marker of monocyte activation in patients with acute coronary syndrome // Circulation. – 2007. – Vol. 115. – P. 3071-3078.

15. Tatzber F., Rabl H., Koriska K. et al. Elevated serum neopterin levels in atherosclerosis // Atherosclerosis. – 1991. – Vol.89. – P.203-208.

© КУНЦ Т. А., ЕФРЕМОВ А. В., ВАКУЛИН Г. М., ОВСЯНКО Е. В.,  
ПУСТОВЕТОВА М. Г.

УДК 616.36–006.68–091.8–092.9

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
КЛЕТОК ПЕЧЕНИ КРЫС НА ПОЗДНИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ  
КАРЦИНОСАРКОМЫ WALKER 256**

Т. А. Кунц, А. В. Ефремов, Г. М. Вакулин, Е. В. Овсянко, М. Г. Пустоветова  
Новосибирский государственный медицинский университет, ректор –  
И.О. Маринкин; Центральная научно-исследовательская лаборатория, рук.  
– д.м.н., проф. М. Г. Пустоветова.

***Резюме.** Проведено изучение клеток печени крыс Wistar на 7-е и 14-е сутки после имплантации клеток карциносаркомы Walker 256 в мышцу бедра. Выявлена корреляция субклеточных проявлений неспецифической эндогенной паранеопластической интоксикации с изменениями морфометрических данных паренхимы и стромы печени. Показано, что тромботическая микроангиопатия, гемолиз деформированных и секвестрированных эритроцитов и адгезия к ним и эндотелию сосудов тромбоцитов являются причинами тканевой гипоксии. Дистрофия, некроз и апоптоз клеток паренхимы и стромы на 7-е сутки опыта сопровождалась субклеточными признаками функционального напряжения в части гепатоцитов, повышением детоксикационных и приспособительных клеточных реакций, снижающихся к 14-м суткам.*

***Ключевые слова:** печень, морфометрия, ультраструктура, карциносаркома Walker 256.*

Кунц Татьяна Анатольевна — научный сотрудник, Центральная научно-

исследовательская лаборатория НГМУ; e-mail: [tkunts@ngs.ru](mailto:tkunts@ngs.ru).

Ефремов Анатолий Васильевич — д.м.н., проф., зав. каф. патологической физиологии и клинической патофизиологии НГМУ; тел. 8(383) 2253978.

Вакулин Геннадий Михайлович — к.м.н., старший научный сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория, НГМУ; тел. 8(383) 2263560.

Печень является центральным органом метаболизма и детоксикации, во многом определяющим гомеостаз организма, который при прогрессии злокачественных опухолей утрачивает гомеостатические функции в связи с наработкой клетками опухолей и, в частности, карциносаркомой Walker 256 (W256) неопластических медиаторов и протеолитических агентов [10, 14]. Повышение при этом генной экспрессии медиаторов цитокинов — трансформирующего фактора роста  $\beta$ , интерлейкина-12, гамма-интерферона различается в выявленных двух типах клеток карциносаркомы: прогрессивного и регрессивного роста [13], которые, как показано ультраструктурно и стереологически, имеют различный дифференцировочный потенциал и разные темпы деградации [5], то есть склонность к некрозам и опухолевому распаду. Последний лежит в основе синдрома неспецифической эндогенной интоксикации (НЭИ) продуктами тканевого распада, повреждающими мембраны нормальных клеток при активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) и повышении уровня свободных радикалов, приводящего также к гемолизу эритроцитов и анемии [1]. Системное, специфическое, дистантное действие опухоли на организм проявляется паранеопластическими синдромами, обусловленными дисбалансом обменных процессов, иммунным конфликтом «опухоль-организм», эктопическим образованием опухолью псевдогормонов,

влиянием на регуляторные системы организма, обеспечивающие гомеостаз [1, 4]. Целью настоящего исследования было изучение морфометрических и субклеточных параметров изменений клеток паренхимы и стромы печени при избранных сроках развития карциносаркомы W256.

### **Материалы и методы**

В эксперименте использовали крыс-самцов Wistar массой 180-200 г. Работу проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации. Суспензию клеток перевиваемой карциносаркомы W256 вводили крысам в мышцу бедра в дозе  $10^6$  клеток [7]. Животные разделены на 2 группы: интактные (n=7) и со спонтанным развитием опухоли (n=14), которых выводили из эксперимента на 7-е и 14-е сутки с момента трансплантации клеток. Для гистологического исследования образцы печени фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, просветляли ксилолом и заключали в парафин. На санном микротоме готовили срезы толщиной 5-6 мкм и окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Морфометрический анализ проводили с помощью окулярной сетки, состоящей из 25 тестовых точек и 5 линий. На препаратах, полученных от каждой группы, исследовали по 100 полей зрения. Методом точечного счета при увеличении  $\times 1000$  определяли долю площади, занимаемой цитоплазмой и ядрами гепатоцитов, синусоидами и клетками синусоидов (общий пул клеток, включающий эндотелиоциты, клетки Купфера, Ито). Подсчитывали численные плотности клеток паренхимы и стромы, ядерно-цитоплазматическое отношение гепатоцитов, долю среди них диплокариоцитов, отношение общего числа клеток синусоидов к общему числу гепатоцитов, а также индекс васкуляризации, представляющий собой отношение площади синусоидов к площади паренхимы [12]. Статистическая обработка результатов заключалась в подсчете средних величин (M) и их стандартных ошибок (m).

Оценка характера распределения, проведенная по тесту на нормальность Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса, показала, что полученные выборки (100 измерений каждого параметра от группы) подчинялись нормальному распределению. Достоверность различий оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента при 95 % уровне значимости [2].

Для электронно-микроскопических исследований образцы печени фиксировали в 4% параформальдегиде (Serva) на 0,1 М фосфатном буфере Миллонига (рН 7,4) при комнатной температуре в течение 2 ч с дополнительной дофиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия на том же буфере на льду в течение 1 ч. После дегидратации образцы заключали в эпоновую смесь и полимеризовали. Полученные на ультратоме LKB-8800 срезы (35-45 нм) контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца, напыляли слоем углерода и изучали в электронных микроскопах JEM-7A и JEM-100S.

### **Результаты и обсуждение**

На 7-е сутки развития карциносаркомы W256 в печени выявлены признаки нарушения кровотока с проявлением сладж-синдрома и тромбоза междольковых артерий и центральных вен. Агрегация эритроцитов и гранулоцитов в просветах синусоидов способствует закупорке части капилляров, застою, расширению синусоидов (рис. 1, б), гипоксии. В перипортальных зонах наблюдаются лимфоидные инфильтраты, в паренхиме – лимфоидные узелки, эозинофилы и тучные клетки, что косвенно может указывать на активацию иммунологических реакций [6]. В печени обнаружены метастазы в виде одиночных опухолевых клеток и их скоплений. Часть гепатоцитов дистрофически изменена, в другой части, в зонах фокальных некрозов, ядра клеток паренхимы пикнотичны, с проявлениями кариолизиса и кариорексиса.

*Рис. 1. Морфометрические показатели печени крыс с карциносаркомой W256 ( $M \pm m$ );*

*а – паренхиматозный компартмент; б – синусоидный компартмент.*

*Примечание: достоверные различия: \* с контролем, # с предыдущим сроком,  $p < 0,05$ .*

*Рис. 1. Морфометрические показатели печени крыс с карциносаркомой W256 ( $M \pm m$ );*

*а – паренхиматозный компартмент, б – синусоидный компартмент*

*Достоверные различия: \* с контролем, # с предыдущим сроком,  $p < 0,05$*

Повышение индекса васкуляризации ( $0,33 \pm 0,02$  при  $0,17 \pm 0,01$  в контроле,  $p < 0,05$ ) на фоне расширения центральных и поддольковых вен указывает на нарушение оттока крови. Расширение лимфатических пространств Малла отражает затруднение оттока внеклеточной жидкости. Увеличение ядерно-цитоплазматического отношения ( $0,33 \pm 0,02$  при  $0,22 \pm 0,01$  в контроле,  $p < 0,05$ ) при снижении относительной площади цитоплазмы гепатоцитов (рис. 1, а), то есть уменьшение среднего размера гепатоцита – свидетельства ослабления в целом функций клеток паренхимы, нередко связанной с развитием апоптоза [3]. Действительно, в части гепатоцитов, наряду с типичной для апоптоза конденсацией хроматина ядер и уплотнения цитоплазмы (рис. 2, б), выявляются черты «ультраконденсации» митохондрий: уплотнение матрикса, маскирующее кристы (рис. 2, а, б). Показано, что апоптозный цикл начинается с устранения межклеточных контактов с расширениями пространств между клетками (рис. 2, а), вычленения и отторжения клеток из клеточных пластов, последующей их компактизацией без деструкции ультраструктур с завершающей клеточной фрагментацией и распадом во внеклеточных пространствах [3]. Достоверное возрастание численной плотности двуядерных гепатоцитов (табл. 1), прирастающих, как известно, за счет ацитокинетических митозов и являющихся родоначальниками полиплоидных клеток, может быть компенсацией недостаточности функций клеток паренхимы. Поэтому, видимо, достоверно повышается численная плотность гепатоцитов (табл. 1), процент площади которых уменьшается в соответствии со снижением их функций (рис.1, а).

*Таблица 1*

***Численные плотности (N) клеток паренхимы и стромы печени крыс с карциносаркомой W256.***

| Численная плотность, N | Контроль         | 7 суток            | 14 суток            |
|------------------------|------------------|--------------------|---------------------|
| Гепатоциты, N          | $21,64 \pm 0,28$ | $24,87 \pm 0,28^*$ | $21,56 \pm 0,23^\#$ |
| Диплокариоциты, N      | $1,24 \pm 0,10$  | $2,01 \pm 0,11^*$  | $1,74 \pm 0,13^*$   |

|                               |           |                        |                         |
|-------------------------------|-----------|------------------------|-------------------------|
| Синусоидные клетки, N         | 8,46±0,31 | 9,40±0,24 <sup>*</sup> | 9,77±0,26 <sup>*</sup>  |
| Диплокариоциты/Гепатоциты     | 0,06±0,00 | 0,08±0,00 <sup>*</sup> | 0,08±0,01 <sup>*</sup>  |
| Синусоидные клетки/Гепатоциты | 0,40±0,02 | 0,38±0,01              | 0,46±0,01 <sup>*#</sup> |

*Примечание: достоверные различия при  $p < 0,05$ : <sup>\*</sup> - с контролем, <sup>#</sup> - с предыдущим сроком.*

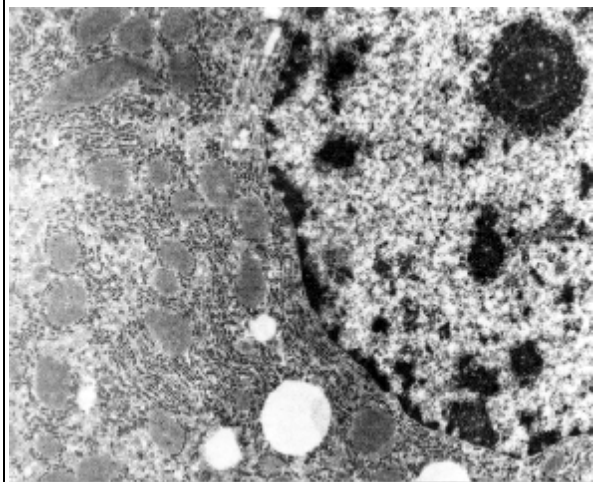
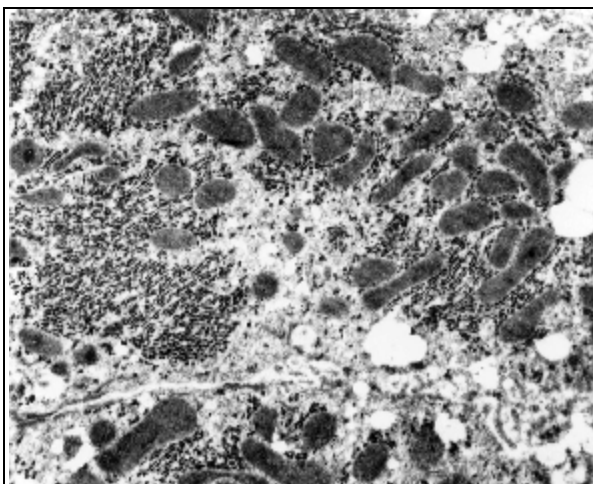
В гепатоцитах, подверженных апоптозу, выявляется увеличенное количество неизменной гранулярной цитоплазматической сети, нередко скомпанованной в крупные пакеты, прилежащие к ядрам, что указывает на их предшествующую функциональную активацию (рис. 2, б). Предшественниками таких клеток, очевидно, были изредка видимые гепатоциты с яркими признаками активации функций – крупными полями компонентов белок-синтезирующей системы у ядер с деспирализованным то есть активным краевым хроматином (рис. 2, в). Не вызывает сомнений, что такая популяция гепатоцитов компенсаторно восполняет функции паренхимы в условиях, когда другая часть ее подвергается некрозу, дистрофии изменениям и апоптозу в условиях действия НЭИ на 7-е сутки опыта. Кроме явных субклеточных нарушений в гепатоцитах пренекротических и некротических зон нередко обнаруживаются мало измененные гепатоциты с проявлением жировой дистрофии – мелкокапельной липидной инфильтрации цитоплазмы, видимой иногда и в апоптозных клетках (рис. 2, а, б), причиной которой, как известно, является нарушение функции экзоцитоза  $\beta$ -липопротеидов.

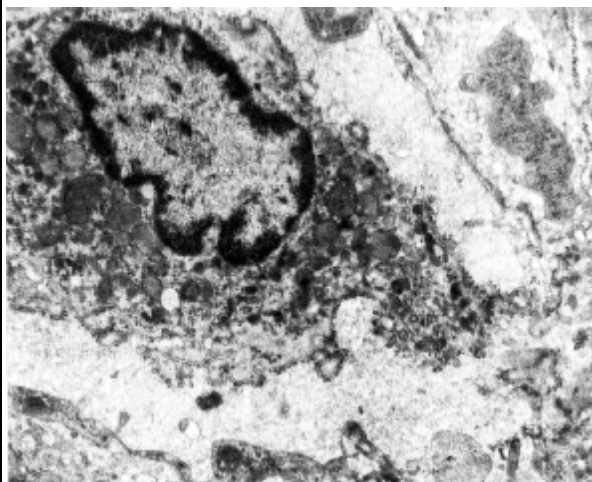
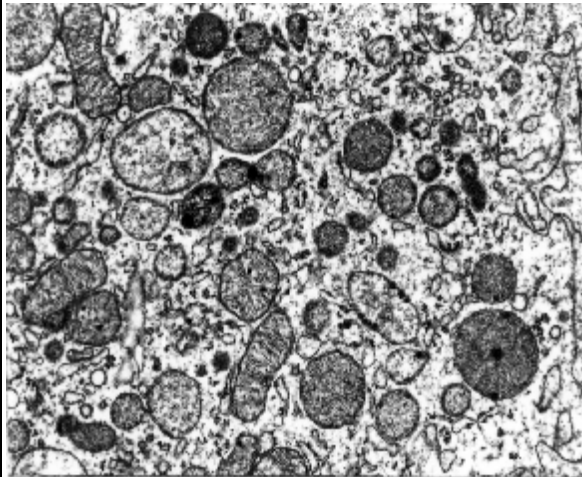
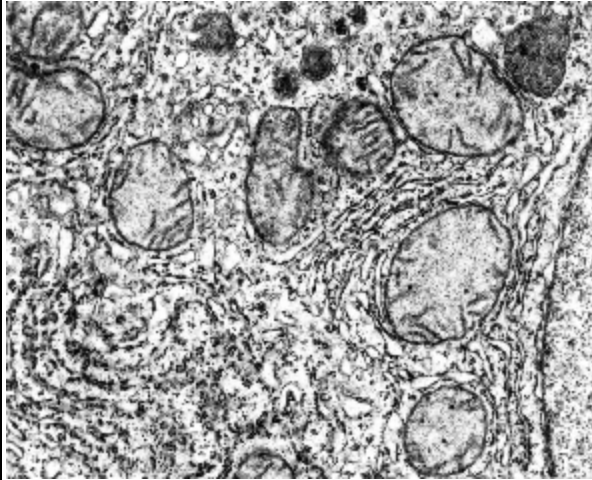
На 7-е сутки развития опухоли в печени отмечаются признаки активации фагоцитоза в увеличенных в размерах клетках Купфера с большим числом лизосом и гетерофагосом (рис. 2, г), содержащих клеточный детрит, что находится в соответствии с некротическим и апоптозным устранением части клеток паренхимы под воздействием НЭИ. Определяется по субклеточным признакам и убыль клеток синусоидов. Так, в синусоидах печени обнаружены апоптозные клетки эндотелия, вычлняющиеся из состава стенок синусоидов (рис. 2, д) с типичными чертами изменений хроматина ядер, митохондрий и уплотненной цитоплазмы. Наблюдаются и деструктивно измененные эндотелиоциты с разрывами плазмалемм, что связано с воздействием опухолевых цитокинов, особенно фактора некроза опухоли, который вызывает деструкцию цитоскелета эндотелия и плазмалемм, подавляя пролиферацию

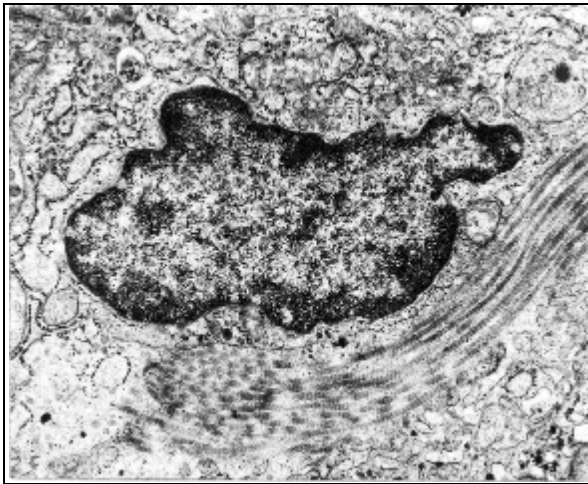
клеток [1]. Возможно, из-за восполнения утраты клеток эндотелия повышается число митозов в неповрежденной их части, что увеличивает число клеток синусоидов (табл. 1).

*Рис. 2. Ультраструктура клеток печени крыс через 7 суток развития карциносаркомы W256; а-фрагмент апоптозных гепатоцитов с плотным матриксом митохондрий, пакетами гранулярной сети, утратой межклеточных контактов на мембранах расширенных межклеточных пространств; б – часть апоптозного гепатоцита с уплотнением цитоплазмы, конденсацией хроматина ядра и крупным скоплением гранулярной сети у ядра; в – фрагмент функционально активного гепатоцита с гиперплазией белок-синтезирующей системы и деспирализацией хроматина ядра; г – фрагмент активированной клетки Купфера с большим количеством гетерофагосом и лизосом; д – фрагмент апоптозного эндотелиоцита, десвамированного из стенки синусоида; е – трансдифференцированная клетка Ито в состоянии активного синтеза внеклеточного матрикса. Увеличение X10000 (а, б, д), X10500 (в), X14000 (г), X8750 (е).*

**а**  
**б**  
**в**  
**г**  
**д**  
**е**







Последние могут прирастать и за счет печеночных макрофагов, устраняющих клеточный детрит, а также клеток Ито, которые, сравнительно с контролем, чаще видны на 7-е сутки опыта, демонстрируя признаки трансдифференциации в миофибробласты (рис. 2, е): утрату липидных капель с витамином А, увеличение поверхности ядер и числа каналов белок-синтезирующей системы со значительным накоплением в них тропоколлагена, появление вплотную к клеткам скоплений коллагеновых фибрилл. Трансдифференциация клеток Ито является ключевым событием фиброгенеза в печени [9], отражающим их активацию в условиях повреждения клеток печени и крови, высвобождающего из них трансформирующий  $\beta$ -фактор роста и фактор роста из тромбоцитов, стимулирующие митозы клеток Ито и последующую продукцию ими внеклеточного матрикса [11]. Так как клетки, продуцирующие коллаген, чаще всего встречаются вокруг зон некротизации гепатоцитов, мы полагаем, что здесь имеет место принцип соединительно-тканного замещения утраченного объема паренхимы.

На 14-е сутки развития опухоли в печени еще больше нарушается архитектура долек печени из-за увеличения зон некроза и дистрофии. Отмечено выраженное расширение сосудов триад, застой в междольковых артериях и лимфатических пространствах Малла. Выявленный тромбоз центральных вен сочетается с десквамацией эндотелия, что тормозит кровоток. Застой в синусоидах (индекс васкуляризации:  $0,28 \pm 0,02$  при  $0,17 \pm 0,01$  в контроле,  $p < 0,05$ ) отражает повышение относительной площади капиллярной сети (рис. 1, б) и субклеточные данные о том, что более часто, чем через 7 суток опыта, видны в расширенных синусоидах скопления гемолизированных и секвестрированных эритроцитов с тромбоцитами (рис. 3, а), подверженные адгезии к эндотелию, что увеличивает площадь синусоидов из-за застойного полнокровия. **Рис. 3** Ультраструктура клеток печени крыс через 14 суток развития карциносаркомы W256 **а**-застойный синусоид с гемолизированными, секвестрированными эритроцитами и адгезией тромбоцитов к эндотелию; **б**-фрагмент гепатоцита с гиперплазией гладкой сети и митохондрий при активации функции детоксикации; **в**-часть гипертрофированного гепатоцита с развитой гранулярной сетью, энергизированными митохондриями и укрупненным ядрышком в состоянии повышенной функции; **г**-фрагмент апоптозного гепатоцита с уплотненной цитоплазмой, конденсацией хроматина, микросегрегацией ядрышка; пространство Диссе заполнено коллагеном; **д**-фрагмент гепатоцита с центриолями (стрелки) и с признаками дисфункции гранулярной сети, митохондрий, хроматина ядра и ядрышка – показателями несостоявшейся адаптивной клеточной реакции; **е**-апоптозно измененный эндотелиоцит синусоида с обилием клеточного детрита.  $\times 10000$  (а, г, е),  $\times 12600$  (б, в, д).

На 14-е сутки развития опухоли в печени снижается число двуядерных клеток как следствие их деления для возмещения некротизации части гепатоцитов, а также увеличивается связанное с этим число клеток стромы (табл. 1). Процент площади стромы и паренхимы несколько возрастает сравнительно с 7 сутками опыта (рис. 1). Интересно, что спустя 14 суток значительно реже наблюдаются гепатоциты с признаками апоптоза, на что указывает увеличение процента площади их цитоплазмы и снижение процента площади ядер (рис. 1, а) и снижение ядерно-цитоплазматического отношения ( $0,28 \pm 0,02$ ) по сравнению с 7 сутками ( $p < 0,05$ ).

Помимо описанных выше гепатоцитов, спустя 14 суток опыта в печени нередко выявляются клетки с гиперплазией гладкой цитоплазматической сети (рис. 3, б), которых на 7-е сутки опыта мало. Обилие гладких мембран и свободных рибосом наблюдается, начиная от ядер до плазмалемм клеток. Нуклеолономность ядрышек богатых гранулами, деспирализация гетерохроматина ядер отражает интенсивный ДНК-зависимый синтез РНК. Известно, что такая структура гепатоцитов типична для печени в состоянии активации функции дезинтоксикации и, видимо, связана с повышением паранеопластической токсической нагрузки на орган: действия протеолитической гиперферментемии, цитокинов и средномолекулярных пептидов [1]. Для части гепатоцитов на 14-е сутки опыта характерна гиперплазия гранулярной цитоплазматической сети, прилежащей к ядрам с крупными ядрышками, совместно с энергизированными митохондриями (рис. 3, в). Эта часть, очевидно, представляет собой популяцию гипертрофированных клеток, несущих повышенную функциональную нагрузку. Выявляются гепатоциты и с мелкокапельной липидной дистрофией, уплотненной цитоплазмой, конденсацией хроматина и микросегрегацией ядрышек (рис. 3, г), то есть чертами апоптоза. Наряду с этим, в зонах фокальных некрозов видны

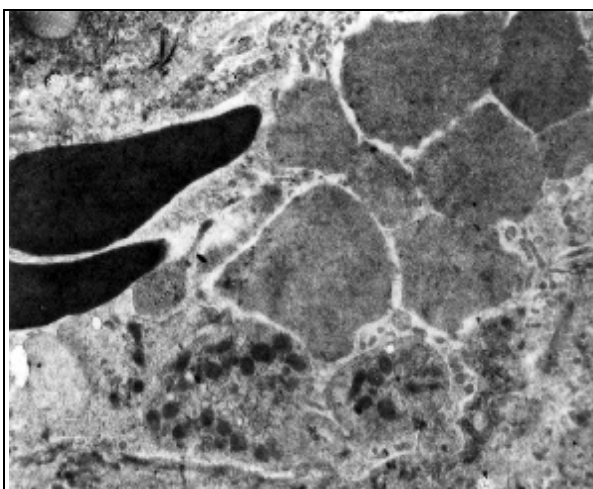
гепатоциты (рис. 3, д), с субклеточными признаками дезинтеграции цитоплазматической сети и митохондрий с расширенными кристами и плотным матриксом, появлением деструктивных зон просветлений хроматина ядер, ядрышками, еще имеющими черты нуклеолонемности, но уже почти утратившими гранулярную часть. Наличие в таких клетках центриолей (рис. 3, д) указывает на несостоявшийся митоз в условиях действия опухолевых цитотоксических факторов, препятствующих реализации компенсаторно-приспособительных клеточных реакций в части гепатоцитов.

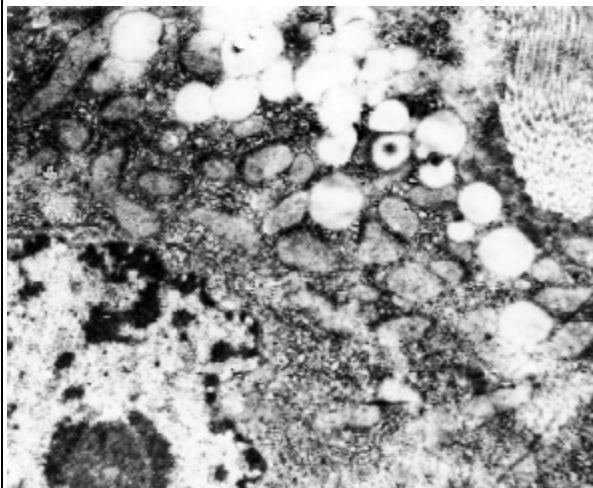
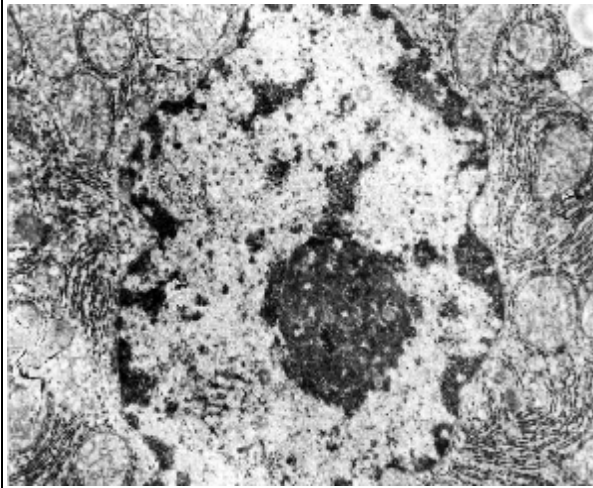
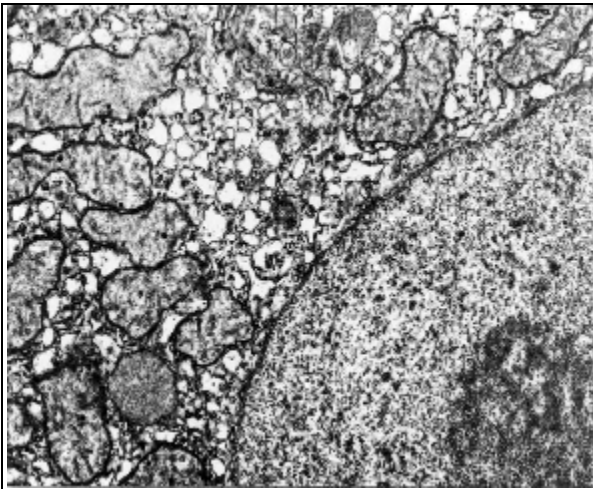
*Рис. 3. Ультраструктура клеток печени крыс через 14 суток развития карциносаркомы W256;*

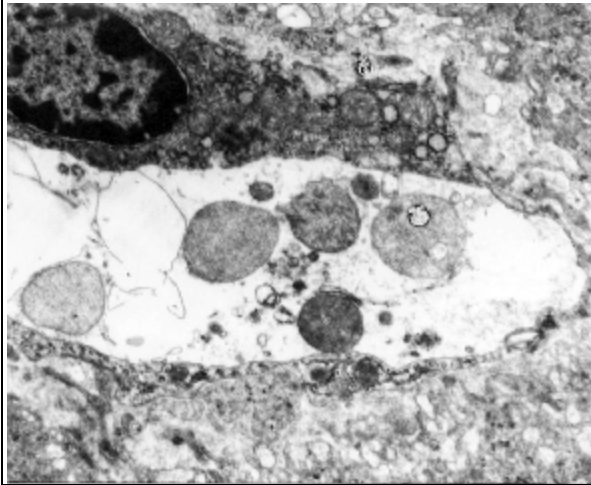
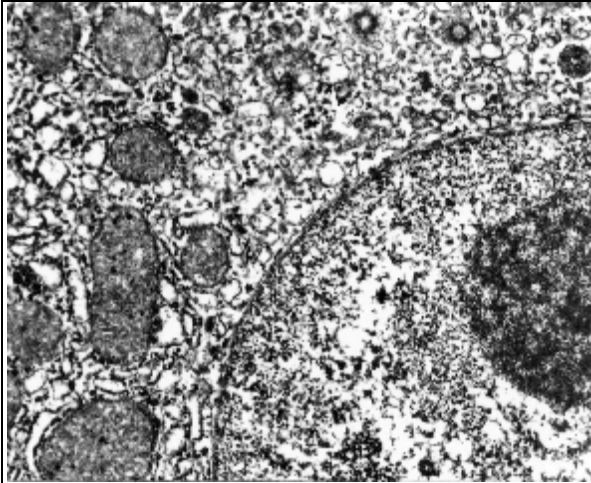
*а – застойный синусоид с гемолизированными, секвестрированными эритроцитами и адгезией тромбоцитов к эндотелию; б – фрагмент гепатоцита с гиперплазией гладкой сети и митохондрий при активации функции детоксикации; в – часть гипертрофированного гепатоцита с развитой гранулярной сетью, энергезированными митохондриями и укрупненным ядрышком в состоянии повышенной функции; г – фрагмент апоптотного гепатоцита с уплотненной цитоплазмой, конденсацией хроматина, микросегрегацией ядрышка; пространство Диссе заполнено коллагеном; д – фрагмент гепатоцита с центриолями (стрелки) и с признаками дисфункции гранулярной сети, митохондрий, хроматина ядра и ядрышка – показателями несостоявшейся адаптивной клеточной реакции; е – апоптотно измененный эндотелиоцит синусоида с обилием клеточного детрита. Увеличение  $\times 10000$  (а, г, е),  $\times 12600$  (б, в, д).*

**а**  
**б**  
**в**  
**г**

**д**  
**е**







Вероятно, в силу этих же причин усиливаются апоптозные изменения клеток эндотелия синусоидов, в которых часто наблюдается клеточный детрит (рис. 3, е) – свидетельство большей повреждаемости клеток печени. По-прежнему, как и на 7-е суток опыта, в клетках Купфера выражена активация фагоцитоза, а клетки Ито имеют признаки трансдифференциации и интенсивного синтеза тропоколлагена, в результате чего большинство пространств Диссе переполнено фибриллами коллагена (рис. 3, г).

Таким образом, дистрофические, некротические и апоптозные изменения клеток паренхимы и стромы печени, по-видимому, являются следствием воздействия повреждающих факторов эндогенной интоксикации в результате системного действия опухоли на организм, которое способствует прогрессии в печени терминальной тромботической ангиопатии, вызывает комплекс клеточных и субклеточных компенсаторно-приспособительных реакций, противостоящих онкофакторам. Такие реакции снижаются к 14-м суткам развития опухоли в силу развития дезинтеграции и гибели гепатоцитов, уже ставших на путь адаптивного восполнения функций утраченных клеток.

В настоящее время при онкопатологии изыскиваются возможности нейтрализации действия опухолевых цитокинов [8], что, с учетом полученных нами данных, вселяет надежду на успех в поиске путей коррекции возникающих в печени при развитии злокачественной опухоли структурно-метаболических нарушений применением мембранопротекторов, повышением детоксикационных потенций органа и стимуляции в нем внутриклеточных гиперпластических процессов, противостоящих паранеопластическим повреждающим и протеолитическим эффектам и токсическому воздействию молекул средней массы.

### **Morphometrics and ultra structural indexes of rat's liver cells in late stages of Walker- 256 carcinocarcinoma**

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

**Abstract.** We studied rat's Wistar liver cells on 7 and 14 days after Walker-256 carcinosarcoma implantation into hip muscle. Correlation of subcellular nonspecific endogenous paraneoplastic intoxication with morphometrics data of liver's parenchyma and stroma were revealed. We showed that thrombotic microangiopathy, hemolysis of deformed and sequestered erythrocytes and platelets adhesion to them and to endothelium cause tissue hypoxia. Parenchymal and stromal cell's dystrophy, necrosis and apoptosis on 7 day of the experiment were accompanied by subcellular signs of functional stress in some hepatocytes, increased detoxication and adaptive cell reactions, which decreased to 14 day.

**Key words:** liver, morphometry, ultra structure, Walker-256 carcinosarcoma

### Литература

1. Ганцев Ш. Х. Онкология. – М., 2004. – 516 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М., 1999. – 459 с.
3. Лушников Е. Ф., Абросимов А. Ю. Гибель клетки (апоптоз). – М., 2001. – 160 с.
4. Онкология / Национальное руководство. – М., 2008. – 1072 с.
5. 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. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – Т. 148, № 9. – С. 337-342.
6. Ройт А., Бростофф Д., Мейл Д. Иммунология. – М., 2000. – 592 с.
7. Хегай И.П., Попова Н.А., Иванова Л.Н. Влияние экспрессии гена вазопрессина на рост карциносаркомы Walker 256 у крыс // Генетика. – 2000. –

T. 42, № 7. – C. 993-995.

8. Elaraj D.M., Weinreich D.M., Varghese S. et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts // Clin. Cancer Res. – 2006. – Vol. 12, № 4. – P. 1088-1096.

9. Gressner A.M. Transdifferentiation of hepatic stellate (Ito) cells to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis // Kidney Int. – 1996. – Vol. 49, № 1. – P. 39-45.

10. Keller H., Eggli P. Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinosarcoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane // Cell Motil. Cytoskeleton. – 1998. – Vol. 41, № 2. – P. 181-193.

11. Okuno M., Adachi S., Akita K. et al. Liver fibrosis and hepatic stellate cells // Connect Tissue. – 2000. – Vol. 32. №4. – P. 401-406.

12. Onori P., Morini S., Franchitto A. et al. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl<sub>4</sub>-treated rats // J. Hepatol. – 2000. – Vol. 33, № 4. – P. 555-563.

13. Perroud A. P. A. S., Ashimine R., Castro G. M. et al. Cytokine gene expression in Walker 256: A comparison of variants A (aggressive) and AR (regressive) // Cytokine. – 2006. – Vol. 36, № 3-4. – P. 123-133.

14. Rebeca R., Bracht L., Noleto G. R. et al. Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors // Cell Biochem. Funct. – 2008. – Vol. 26, № 6. – P. 731-738.

© СИДОРЕНКО Ю.С., ШИХЛЯРОВА А.И., ФРАНЦИЯНЦ Е.М.,  
НЕПОМНЯЩАЯ Е.М., КОМАРОВА Е.Ф., БАРСУКОВА Л.П.,  
МАРЬЯНОВСКАЯ Г.Я., Т.П. ПРОТАСОВА

УДК: 001.5:616-07:616.84:612.014.426

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО  
ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОДАЛЬНЫХ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ  
В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Ю.С. Сидоренко, А.И. Шихлярова, Е.М. Франциянц, Е.М. Непомнящая, Е.Ф.  
Комарова, Л.П. Барсукова, Г.Я. Марьяновская, Т.П. Протасова

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, Ростов-на-  
Дону, директор – д.м.н., проф. О.И. Кит.

***Резюме.** В экспериментах на 78 белых крысах с эктопическим ростом в легких саркомы 45 установлено противоопухолевое действие сверхнизкочастотного магнитного поля с частотами импульсов, близких к ритмам головного мозга, и СКЭНАР-терапии. Характер регрессии опухолевых узлов и компенсаторных процессов в ткани легкого отражает способность ксонастройке центральных и местных механизмов обеспечения структурного гомеостаза, проявлением которого служит активация клеточных элементов соединительной ткани (лимфоцитов, фибробластов, макрофагов, альвеолоцитов II типа и др.), эластических и ретикулярных волокон.*

***Ключевые слова:** эктопический рост саркомы 45, морфология легких, магнито- и СКЭНАР-терапия, противоопухолевый эффект.*

Сидоренко Юрий Сергеевич – академик РАН и РАМН, зам. директора по науке ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический

институт Минздравсоцразвития России»; e-mail: [rnioi@list.ru](mailto:rnioi@list.ru).

Шихлярова Алла Ивановна – д.б.н., проф., рук. лаборатории биофизики рака ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздравсоцразвития России»; e-mail: [rnioi@list.ru](mailto:rnioi@list.ru).

Франциянц Елена Михайловна – д.б.н., проф., руководитель гормональной лаборатории ФГУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздравсоцразвития России»; e-mail: [rnioi@list.ru](mailto:rnioi@list.ru).

Интерес к изучению сочетанного центрального и периферического влияния на мозг при опухолях внеомозговой локализации, с одной стороны, связан с тем, что процессы опухолевой трансформации в значительной степени обусловлены потерей контроля со стороны нервной системы и следующей за этим утратой тканевой регуляции. С другой стороны, опираясь на кортико-висцеральную теорию патологии, не исключается возможность интегративной регуляции роста неоплазмы при контролируемых воздействиях на уровне мозга и тканевых эффекторных систем [1,6].

Известна высокая чувствительность мозга к сверхнизкочастотному магнитному полю малой интенсивности (СНЧМП) [4], а также возможные механизмы его противоопухолевого, антиканцерогенного и антистрессорного влияния [8, 10, 11, 12]. Использование полимодальной технологии создает условия для повышения эффективности центральной (на мозг) магнитотерапии СНЧМП путем сочетания с периферическим (в проекции органа-мишени) СКЭНАР-воздействием электроимпульсов. В механизме реализации последнего принимают участие регионарные, сегментарные и генерализованные реакции, которые связаны с изменениями афферентов соматосенсорной системы, факторов локальной сосудистой регуляции и эндогенных регуляторов иммунитета [3, 5, 12].

Целью исследования явилась оценка возможности восстановления тканевой

регуляции на основе анализа результатов экспериментально-гистологических исследований органа-мишени, подверженного опухолевой трансформации, при центральном и периферическом воздействиях полимодальных факторов.

### **Материалы и методы**

В настоящем исследовании были использованы 78 белых беспородных крыс-самцов (180-200 г) разводки вивария ФГУ «РНИОИ Росмедтехнологий». Штамм саркомы 45 был получен в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (Москва). Клетки опухоли вводили в подключичную вену крыс в объеме 0,5 мл, содержащем 2 млн. опухолевых клеток и стерильный физиологический раствор.

Через 1 неделю после эктопической перевивки в лёгкое клеток саркомы 45 и на протяжении 5 недель проводили воздействие физическими факторами – СНЧМП и СКЭНАР без специального противоопухолевого химио- или лучевого лечения. Воздействие СНЧМП осуществляли на голову животного-опухоленосителя в период с 9 до 10 часов утра с последовательностью частот 0,03 Гц – 0,3 Гц – 9 Гц, временем предъявления сигнала – 5 мин. – 1 мин. – 1 мин. и интенсивностью 5 мТл – 3,5 мТл – 2,8 мТл соответственно. Каждое из значений интенсивности на протяжении курса уменьшали по экспоненте с коэффициентом 0,7, доходя до уровня значений 0,8 мТл – 0,5 мТл – 0,3 мТл. Через 15-20 мин. после СНЧМП следовало СКЭНАР-воздействие, заключающееся в обработке кожных покровов импульсным электрическим током вдоль позвоночника с амплитудой 135 у.е., а на области проекций легких, печени и грудины – от 30 до 60 у.е. (в зависимости от чувствительности) и модуляцией 2:1 при ежедневном изменении частоты в алгоритме 15,3 Гц – 18,6 Гц – 24,4 Гц – 30,5 Гц – 33,6 Гц.

Для верификации опухолевого процесса на этапах эктопического роста С - 45 животных декапитировали, предварительно усыпив парами хлороформа, извлекали легкие, подсчитывали количество опухолевых узлов и определяли их размер. Для гистологического исследования брали верхнюю и нижнюю доли правого и левого легкого, кусочки ткани фиксировали в растворе 10%

нейтрального формалина с последующей стандартной проводкой через спирты восходящей концентрации и заключали в парафин. Приготовленные из парафиновых блоков гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопию осуществляли в проходящем свете при увеличении Ч5, Ч10, Ч40, Ч100 (Leica DM LS2). Для статистической обработки результатов экспериментов использовали параметрические методы в пакете прикладных программ Statistica v. 6.1. Достоверными считали различия между основной и контрольной группами при уровне значимости  $p \leq 0,05$  и  $p \leq 0,01$ , вычисленного по t-критерию Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

К одному из наиболее значимых результатов лечебного влияния СНЧМП и СКЭНАР-терапии мы отнесли показатели продолжительности жизни животных-опухоленосителей. При анализе сроков жизни у крыс контрольной группы (без воздействия) и опытной группы «с эффектом» и «без эффекта» было установлено, что период времени от момента «выхода» опухолевых узлов в ткани легкого вплоть до момента гибели существенно различался (табл. 1).

Таблица 1

**Основные параметры роста и развития опухолей в легких крыс после применения электромагнитного воздействия**

| Показатели                                                 | Группы животных                      |                                       |                                      |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
|                                                            | Контрольная (без воздействия) (n=22) | Опытная (с воздействием)              |                                      |
|                                                            |                                      | «без эффекта» (n=10)                  | «с эффектом» (n=46)                  |
| Продолжительность жизни, дни (недели)                      | 38,5±3,5 (5-6 недель)                | 108,5±3,5 <sup>1</sup> (15-16 недель) | более 315 <sup>1,2</sup> (45 недель) |
| Срок «выхода» опухолевых узлов после введения С-45, недели | 3-4                                  | 5-6                                   | 5-6 или отсутствуют                  |
| Количество опухолевых узлов в сроки «выхода», штук         | 5-7                                  | до 6                                  | 4-5 или отсутствуют                  |

|                                                            |          |          |                                         |
|------------------------------------------------------------|----------|----------|-----------------------------------------|
| Размеры опухолевых узлов в сроки «выхода», см <sup>3</sup> | 0,5±0,05 | 0,4±0,05 | 0,2±0,05 <sup>1,2</sup> или отсутствуют |
|------------------------------------------------------------|----------|----------|-----------------------------------------|

*Примечание.* <sup>1</sup> – статистически достоверно по отношению к показателям группы без воздействия ( $p \leq 0,05$ ); <sup>2</sup> – достоверно по отношению к группе «без эффекта» от примененного воздействия ( $p \leq 0,05$ ).

Так, у животных с эффективным воздействием продолжительность жизни была увеличена в 7 раз относительно контроля. Увеличение сроков жизни с 5 до 15 недель было отмечено и у крыс-опухоленосителей без выраженного противоопухолевого эффекта, что на фоне стабилизации роста опухоли свидетельствовало об общем биорегуляторном влиянии используемых факторов. Достоверные межгрупповые различия были получены и по показателям размеров опухолевых узлов в срок «выхода». В опытной группе крыс «с эффектом» лечения объем опухолевых узлов был в 2,5 раза меньше, чем в контроле, причем у 48% крыс, поддавшихся лечебному влиянию СНЧМП и СКЭНАР, опухолевые узлы не были обнаружены, а в 28% – отмечено наличие единичных мелких узлов, что можно отнести к эффекту торможения роста опухоли. Таким образом, суммарный противоопухолевый эффект составил 76%, что, в отличие от 100% роста опухоли в контроле, позволяло отнести применяемые воздействия к факторам с высокой противоопухолевой эффективностью.

Гистологический контроль легких через одну неделю от момента перевивки опухоли до начала воздействий СНЧМП и СКЭНАР-терапии показал, что первичные изменения в ткани верхней и нижней долей левого и правого легкого идентичны в обеих группах животных. К одному из первых пусковых механизмов патологического влияния опухолевых клеток на ткань легкого можно было отнести редукцию кровотока и обильные крупноочаговые кровоизлияния. Фактически, вся ткань легкого была пропитана кровью, межалвеолярные пространства были заполнены массой эритроцитов, а также скоплением лимфоцитов (рис. 1а). В результате такой «атаки» возникали крупные очаги дистелектаза, межуточная пневмония, участки микроабсцессов в

просвете альвеол.

«Разрушительный» этап в легких крыс продолжался и на 2-й неделе после перевивки в обеих группах, несмотря на начало СНЧМП и СКЭНАР-воздействий. На препаратах легкого в нижней и верхней долях наблюдалась деградация бронхиоло-альвеолярных структур, главным образом, из-за выхода из просвета сосудов агрегаций опухолевых клеток и их прорастанием в виде тонких удлинённых тяжей (рис. 1б). По мере опухолевого роста границы между отдельными тяжами сливались и образовывались крупные конгломераты опухолевых клеток с изогнутой краевой линией, отделяющей их от пропитанной кровью ткани легкого (рис. 1в). Формирование опухолевых узлов характеризовалось сдавлением и разрушением легочных структур, плотной упаковкой опухолевых клеток, сохраняющих типичную для С-45 веретеновидную форму и высокий пролиферативный потенциал, что подтверждалось обилием фигур патологического митоза (рис. 1г).

При продолжении лечебных сеансов магнито- и СКЭНАР-терапии обнаружили деструктивные изменения в опухолевых узлах легких. Начиная с 3-й недели от момента перевивки С-45, обращала на себя внимание мобилизация клеточного звена иммунной системы и формирование плотного кольца зрелых лимфоцитов по периферии опухолевого узла (рис. 2а). Вместе с гистиоцитами, макрофагами, фибробластами лимфоидные клетки проникали в промежутки между отдельными сформированными группами опухолевых клеток, что способствовало дезинтеграции и ослаблению целостности опухолевого узла [2]. Иными словами, одними из первых проявлений влияния управляющих воздействий на злокачественную опухоль внутриорганной локализации явилось нарушение ее территориальной целостности и формирование микропопуляций опухолевых клеток в виде объединений типа синцитиев (рис. 2б).

На препаратах опухоли легкого были отмечены значительные участки единичных или мелких групп опухолевых клеток, разграниченных клетками

соединительной ткани с преобладанием лимфоцитов и фибробластов (рис. 2в). Наблюдались инволютивные изменения со стороны ядерного аппарата опухолевых клеток – явления кариорексиса, кариолизиса. На отдельных участках скопления голых гиперхромированных ядер отмечалось распыление ядерного хроматина – «ядерный взрыв», характеризующий распад геномной основы клеток опухоли (рис. 2г). Клетки принимали вид теней, сохраняя расплывчатые очертания расплавленной цитоплазмы (рис. 2д). На 5-6 неделях в ткани легкого у крыс с выраженным противоопухолевым эффектом были обнаружены аморфные гомогенно окрашенные поля, образованные лизированным материалом опухоли, а также разрастание молодой соединительной ткани.

Сопоставляя ход опухолевой прогрессии после внутривенной перевивки саркомы 45 в легкое крыс с последовательностью этапов регрессии опухоли при эффективных воздействиях СНЧМП и СКЭНАР-терапии можно отметить диаметрально противоположную направленность связанных между собой процессов: в первом случае – от клеток, к популяции и опухоли, а во втором – от опухоли, к популяции и клеткам. Эта отличительная особенность прямого и обратного развития опухоли, отражает реализацию механизмов межсистемной интеграции в организме-опухоленосителе, где в роли пускового управляющего воздействия выступают факторы электромагнитной природы.

Под влиянием изменчивости среды (ткань легкого) в условиях внешних регуляторных воздействий (СНЧМП и СКЭНАР-терапии) в популяции опухолевых клеток возрастала гетерогенность. Отдельные группы опухолевых клеток проявляли признаки утраты злокачественности, начиная с трансформации доминирующей веретеновидной формы в округлую, отмечалось выстраивание клеток в однослойные структуры линейного или фолликулоподобного типа (рис. 3а-б), усиление процессов клеточной регенерации. Во многих полях зрения обнаруживались значительные участки, заполненные фибробластами (рис. 3в). Известно, что эти клетки способны

вырабатывать эластин, образующий эластические волокна, которые располагаются в межалвеолярных стенках и обеспечивают основную опорную функцию. Кроме того, были обнаружены скопления альвеолоцитов II типа (пнеumoциты II порядка), представляющие собой активно секретирующую и пролиферирующую эпителиальную поверхностную клетку, вырабатывающую фосфолипиды, главным компонентом которых является дипальмитоилфосфатидилхолин. Известна роль этого секреторного продукта в образовании сурфактанта, обеспечивающего уменьшение межмолекулярных сил тканевой жидкости в альвеолах, снижению поверхностного натяжения и раздувания альвеолярных мешочков для усиления воздухообмена (рис. 3д).

О формировании защитно-компенсаторных процессов в легких крыс, пораженных опухолью при эффективных воздействиях СНЧМП и СКЭНАР-терапии свидетельствовало состояние и таких соединительнотканых элементов, как макрофаги, тучные клетки, эластические, коллагеновые и ретикулярные волокна. На препаратах встречались эластические структуры околодольковой, междольковой, межсосудистой, перивазальной и перибронхиальной локализации. Волокна имели слоистое расположение и характеризовались выраженной резервной извилистостью (рис. 4а). Увеличение содержания ретикулярных волокон свидетельствовало о повышении активности обменных процессов в легких. Глубокие качественные преобразования легочной соединительноткан стромы выражались в приобретении волокнами пучкового характера за счет латеральной агрегации при бронхиолярных структурах (рис. 4б). По ходу волокон наблюдались перехваты и колбообразные выпячивания – ложные бронхи, окруженные скоплением бронхоассоциированных лимфоидных элементов (БАЛТ-система), что являлось структурной основой внесосудистых иммунных реакций в легких (рис. 4в). Особого внимания заслуживало сохранение реснитчатого эпителия в бронхах легкого крысы с характерным подслоем гладких мышечных волокон, слоем базальных клеток и цилиндрического эпителия (рис. 4г). Функционирование

слизистой оболочки бронхиол во многом обеспечивало условия сохранения респирации в условиях онкопатологии.

Учитывая дистрофический и дегенеративный характер преобразований ткани опухоли и восстановительную направленность гистологических изменений в ткани лёгкого, по-видимому, можно считать оправданным подход к сочетанному (центральному и локальному) полимодальному воздействию факторов электромагнитной природы, который реализует принцип двойного управления функциями [7]. Способность к сонастройке центральных и местных механизмов обеспечения структурного гомеостаза продемонстрирована активацией клеточного микроокружения опухоли эктопически растущей в ткани лёгкого. Механизмы восприятия, передачи и кумуляции электромагнитного сигнала во многом не ясны. По-видимому, от мембран рецепторов сигнал может трансформироваться и распространяться через системы молекулярных посредников – аденилатциклазу, ЦАМФ, кальциевый и др. механизмы. Необходимо подчеркнуть, что по данным К.В. Судакова [10], П.В. Симонова [9], Е. Hedbom [13], на уровне информационной системы мозга, которую, в первую очередь, представляют неокортекс и гиппокамп, происходит перекодировка, трансформация сигнала и передача информации молекулам соединительной ткани, гормонам, олигопептидам, простагландинам, гликопротеинам, иммунным комплексам, механизмы работы которых полифункциональны. Мы обращаемся к естественным аутоколебательным процессам, органически присущим организму и его подсистемам. Роль СНЧМП и СКЭНАР является лишь триггерной, пусковой и запускаемые механизмы самоорганизации могут быть рассмотрены как альтернатива дезинтеграционному влиянию опухоли. Возможность коррекции и синхронизации биологических процессов создаёт условия повышения противоопухолевой резистентности и оказывает «колебательную» помощь организму во взаимоотношениях с опухолью. Этому способствует технология сочетания центрального (СНЧМП)- и периферического (СКЭНАР)-воздействия,

позволяющая реализовать повышение защитного потенциала организма также и в условиях специфической противоопухолевой терапии.

## **HISTOLOGICAL CRITERIA OF ANTI TUMOR INFLUENCE OF POLYMODAL PHYSICAL FACTORS IN THE EXPERIMENT**

Yu.S.Sidorenko, A.I.Shikhlyarova, E.M.Frantziyantz, E.M.Nepomnyashaya,  
E.F.Komarova, L.P.Barsukova, G.Ya.Maryanovskaya, T.P.Protasova

Federal State Institution «Rostov Cancer Research Institute»

**Abstract.** Anti tumor effect of ultra low intensity magnetic field with intensity close to brain rhythms and to SCENAR-therapy was found out in the experiment on 75 white rats with ectopic growth of carcinoma 45 in lungs. Regression pattern of tumor nodules and compensatory process in the tissue reflect ability of central and local mechanisms of structural homeostasis to co-settings by activating cellular elements of connective tissue (lymphocytes, fibroblasts, macrophages, type II alveolocytocytes etc.), elastic and reticular fibers.

**Key words:** ectopic growth of carcinoma 45, lung's morphology, magnetic and SCENAR-therapy

### **Литература**

1. Балабан П.М., Гуляева Н.В. Общность молекулярных механизмов нейропластичности и нейропатологии: интегративный подход // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова – 2006. – Т. 92, № 2. – С. 145-151.
2. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Кузьменко Т.С. и др. Антистрессорные реакции и активационная терапия. Реакция активации как путь к здоровью через процессы самоорганизации. – Екатеринбург: Филантроп, 2002. – 196 с.
3. Гринберг Я.З. СКЭНАР-терапия: эффективность с позиций методов электролечения / СКЭНАР-терапия и СКЭНАР-экспертиза // Сб. статей. – Таганрог, 1996. – Вып. 2. – С. 18-32.
4. Музалевская Н.И., Урицкий В.М. Противоопухолевое действие слабого

сверхнизкочастотного стохастического магнитного поля со спектром  $1/f$

// Биофизика – 1997. – Т. 42, № 4. – С. 961-970.

5. Ревенко А.Н. Адаптационно-адаптивная регуляция (СКЭНАР): теоретическое и практическое обоснование / СКЭНАР-терапия и СКЭНАР-экспертиза // Сб. статей. – Таганрог, 1998. – Вып. 1. – С. 16-27.

6. Саркисов Д.С. Очерки по структурным основам гомеостаза. – М.: Медицина, 1977. – С. 125-152.

7. Саркисов Д.С. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций. – М.: Медицина, 1987. – 275 с.

8. Сидоренко Ю.С. Некоторые медико-биологические аспекты биотерапии рака. – Ростов н/Д: ЗАО «Ростиздат», 2008. – 544 с.

9. Симонов П.В. Информационный мозг. – М., 1993. – 350 с.

10. Судаков К.В. Информационный принцип в физиологии: анализ с позиций общей теории функциональных систем // Успехи физиол. наук. – 1995. – Т.26, №4. – С. 3-24.

11. Франциянц Е.М., Шихлярова А.И., Кучерова Т.И. Роль антиоксидантных систем мозга в механизме антиканцерогенного влияния сверхнизкочастотных магнитных полей // Вопр. онкологии. – 2002. – Т. 48, №2. – С.216-222.

12. Шихлярова А.И., Максимов Г.К., Барсукова Л.П. и др. Регуляторное влияние сверхнизкочастотных магнитных полей на энергетический метаболизм мозга и печени крыс-опухоленосителей (на модели саркомы 45 и химического канцерогенеза) // Вестн. ЮНЦ. – 2006. – Т. 2, № 2. – С. 96-103.

13. Hedbom E. Characterization of a family of proteoglycans with the capacity to bind collagens: Doct. diss. – Lond. Univ. – 1993. – 380 p.