

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК КРОВИ КРЫС
ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННЫХ
ЭСТРОГЕНЗАВИСИМЫХ ОПУХОЛЕЙ ЯИЧНИКОВ**

Е.А. Сладкова¹, М.Ю. Скоркина¹, Н.И. Жернакова², В.Н. Дмитриев³, Е.В. Жернаков⁴

¹ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Медицинский институт, ¹кафедра биохимии; ²кафедра семейной медицины;
³кафедра факультетской хирургии; ⁴кафедра акушерства и гинекологии

Используя модель экспериментальной гормонозависимой опухоли яичников половозрелых самок крыс, изучили морфофункциональные свойства форменных элементов крови, тесно контактирующих с неопластическими клетками яичника. С использованием современных технологий АСМ-сканирования и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии показано, что развитие опухолевого процесса в организме сопровождается снижением жизнеспособности и увеличением числа погибших лимфоцитов. Функционально ведущими популяциями, реагирующими на развитие опухолевого процесса в организме, являются лейкоциты, для которых характерны реакции распластывания и сглаживания микрорельефа поверхности. Развитие опухолевого процесса сопровождается изменением упругости клеток крови, что позволяет на ранних стадиях диагностировать опухолевые трансформации, протекающие в различных тканях и органах.

Ключевые слова: гормонозависимая опухоль яичников, форменные элементы крови, атомно-силовая микроскопия, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, микрорельеф, упругость.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-1(69)-91-95

**MORPHOFUNCTIONAL PROPERTIES OF THE RATS BLOOD CELLS
IN THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTALLY INDUCED
ESTROGEN-DEPENDENT OVARIAN TUMORS**

E.A. Sladkova¹, M.Yu. Skorkina¹, N.I. Zhernakova², V.N. Dmitriev³, E.V. Zhernakov⁴

*FSAEI HE «Belgorod State National Research University», Medical Institute, ¹Department of Biochemistry;
²Department of Family Medicine; ³Department of Faculty Surgery; ⁴Department of Obstetrics and Gynecology*

Using the model of the experimental hormone-dependent tumor of the ovaries of mature female rats, the morphofunctional properties of the blood constituents closely associated with neoplastic ovarian cells were studied. Using modern technologies of AFM scanning and confocal laser scanning microscopy, it is shown that the development of the tumor process in the body is accompanied by a decrease in viability and an increase in the number of dead lymphocytes. Functionally, the leading populations that respond to the development of the tumor process in the body are leukocytes, which are characterized by the reactions of spreading and smoothing out the microrelief of the surface. The development of the tumor process is accompanied by a change in the elasticity of blood cells, which allows early diagnosis of tumor transformations in various tissues and organs.

Key words: hormone-dependent ovarian tumor, blood shaped elements, atomic force microscopy, confocal laser scanning microscopy, microrelief, elasticity.

Одной из ключевых задач современной клеточной биологии является изучение механизмов межклеточного взаимодействия в условиях опухолевого роста в организме. Известно, что рост новообразований зависит от степени развитости в них сосудистой системы. В ряде экспериментальных работ представлены данные о том, что эндотелиальные клетки микрососудов выделяют в экстрацеллюлярный матрикс опухолевых образований ряд факторов роста (например, фактор роста фибробластов и тромбоцитов, инсулиноподобный фактор роста, гепаринсвязанный эпителиальный фактор роста, интерлейкины) [8]. Причем установлена достоверная разница в количестве и плотности внутриопухолевых сосудов в злокачественных эпителиальных опухолях яичников по сравнению с доброкачественными вариантами [7]. Однако механизмы супрамолекулярного и клеточного

взаимодействия между опухолевыми клетками и форменными элементами крови остаются практически неизученными, что не позволяет пока создать единую концепцию опухолевого роста и объективно изучить степень вовлечения в этот процесс системы крови.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение морфофункциональных свойств форменных элементов крови крыс в условиях моделирования экспериментальных эстрогензависимых опухолей.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть работы выполнена на 30 беспородных лабораторных половозрелых (3 месяца) самок крысы серой (*Rattus norvegicus*).

Работа проведена с соблюдением требований Хельсинкской декларации по гуманному обращению с животными. Крыс содержали в виварии в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 18–20 °С и относительной влажности воздуха 30–70 %. В комнатах содержания соблюдали 12 часовой цикл освещения «день-ночь» и не менее чем 11-кратную смену объема воздуха в час, концентрация CO₂ не более 0,15 объемных %, аммиака не более 0,001 мг/л. Животные получали стандартный пищевой рацион (ПК-120-1) и воду, соответствующую ГОСТу «Вода питьевая» 2874-82. Вес животных на начало эксперимента составлял 100–120 г. По истечении периода адаптации формировали опытную и контрольную группы по 15 особей в каждой. Животных по группам распределяли рандомизированно, с использованием в качестве основного критерия массу тела, так, чтобы различия по этому показателю между особями не превышали 10 %.

Модель эстрогениндуцированных опухолей яичников создавали путем введения 17β-эстрадиола (эстрон), под торговым названием фолликулин. В проведенном исследовании использовали масляный раствор эстрогена, 1 мл которого содержал в пересчете на 100 % сухого вещества 1 мг эстра-1,3,5-(10)триен-17-он. Гормон вводили животным опытной группы внутривенно в концентрации 0,6 Ед/день в течение 14 дней. Объем одной инъекции составлял 0,1 мл, содержащий 6 Ед активного действующего вещества [1]. Параллельно контрольной группе животных вводили 0,1 мл физраствора. Создаваемая экспериментальная модель индукции опухолевых клеток основана на литературных данных с учетом доз эстрадиола 0,2 мкг/день, 0,02 мкг/день и 2 мкг/день, которые обладают эндокринным и генотоксическим эффектом у оварэктомированных крыс [2].

В ходе проведения эксперимента контролировали процесс опухолевого перерождения яичников, используя гистологические срезы яичников. Гистологические препараты яичников готовили общепринятыми способами. Заливку материала осуществляли в парафин, срезы, толщиной 5 мкм, готовили на микротоме, окраску проводили с использованием гематоксилина-эозина. Анализ срезов яичников выполнен на анализаторе изображений «ВидеоТест».

Морфофункциональные свойства форменных элементов крови изучали в условиях *ex vivo*. Забор крови проводили через 30 дней от начала исследования. Кровь брали у предварительно наркотизированных животных, непосредственно из сосудов, питающих опухоль. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 20 Ед/мл. Проводили разделение проб крови на лейкоциты и эритроциты. Кровь центрифугировали 10 мин при 1500 об./мин, собирали нижнюю часть плазмы, богатую лейкоцитами, и лейкоцитарное кольцо. Примесь эритроцитов разрушали 0,83%-м раствором хлорида аммония. Лейкоциты дважды отмывали

изотоничным буферным раствором (раствор Дульбекко, pH = 7,4). Эритроциты также отмывали и ресуспендировали в изотоничном буферном растворе. С целью сохранения жизнеспособности клеток перед сканированием их помещали во влажную камеру [6]. Сканирование проводили методом АСМ в полуконтактном режиме на СЗМ Интегра Вита (Зеленоград, Россия, 2009), используя кантилеверы серии NSG03 с радиусом закругления зонда до 10 нм. Сканировали по 20 клеток из каждой пробы. На основе полученных сканов строили кривые профиля участков поверхности, на которых измеряли геометрические параметры клеток (диаметр, высоту, площадь поверхности, объем), используя программное обеспечение Nova. Жесткость форменных элементов крови исследовали в режиме силовой спектроскопии (АСС) [5]. Силовую нагрузку на клетки накладывали в 25 стандартных точках клеточной поверхности. По полученным данным строили карты наноидентирования, используя программное обеспечение «Ef3».

Учитывая генотоксический и пролиферативные эффекты эстрогенов, обуславливающие их вовлечение в процесс канцерогенеза, необходимым этапом в проведенном исследовании была оценка жизнеспособности клеток крови в условиях развития опухоли. С целью оценки цитотоксичности эстрогенов применяли флуоресцентный метод анализа жизнеспособности клеток крови с двойным окрашиванием – этидиум бромидом (Helicon, USA) и ацетооксиметиловым эфиром кальцеина (Fluka, Switzerland). Использовали стоковые растворы красителей согласно инструкции производителя, из которых готовили рабочий раствор: 4 μМ этидиум бромида и 2 μМ ацетооксиметилового эфира кальцеина растворяли в 1,5 мл раствора Дульбекко (ПанЭко, Россия). К 100 мкл суспензии клеток, находящихся в среде 199 (ПанЭко, Россия), добавляли 10 мкл двухкомпонентного флуоресцентного раствора красителей и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. По истечении времени инкубации 100 мкл клеточной суспензии наносили на покровные стекла (25 × 25 мм), дважды отмывали от красителя и компонентов среды в фосфатно-солевом буферном растворе. Сканирование клеточных суспензий осуществляли на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus (Япония, 2012). На полученных сканах подсчитывали количество живых (зеленая флуоресценция в цитоплазме) и мертвых клеток (красная флуоресценция в ядре) на каждые 100 клеток. Жизнеспособность клеток (%) рассчитывали по формуле [9]:

$$R = \frac{N_n}{N_n + N_d} * 100 ,$$

где R – жизнеспособность клеток, %;

N_n – количество живых клеток;

N_d – количество мертвых клеток.

Полученные экспериментальные данные обработаны методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие опухолевых перерождений яичников наблюдали через 28 дней от начала инъекций у 33 % животных экспериментальной группы, из них в 20 % случае установлено образование гранулезоклеточных опухолей и в 13 % случаев – текаклеточных типов.

Гранулезоклеточная опухоль (фолликулома) представляла собой плотноэластическую опухоль

с гладкой или бугристой поверхностью, иногда с мелкими кистами и очагами размягчения. В гистологических препаратах гранулезоклеточной опухоли видны поля, тяжи и розетки из зернистых (гранулезных) клеток, отделенных от стромы (рис. 1а). В препаратах обнаружены клетки призматического и кубического эпителия с округлыми или удлинёнными нормохромными ядрами. Цитоплазма у некоторых клеток отсутствует, но там, где сохранилась, она базофильно окрашена, умеренно развита с четкими контурами, часто содержит мелкие гранулы. Располагаются клетки комплексами, тяжами и небольшими розеткоподобными группами. Некоторые клетки располагаются разрозненно.

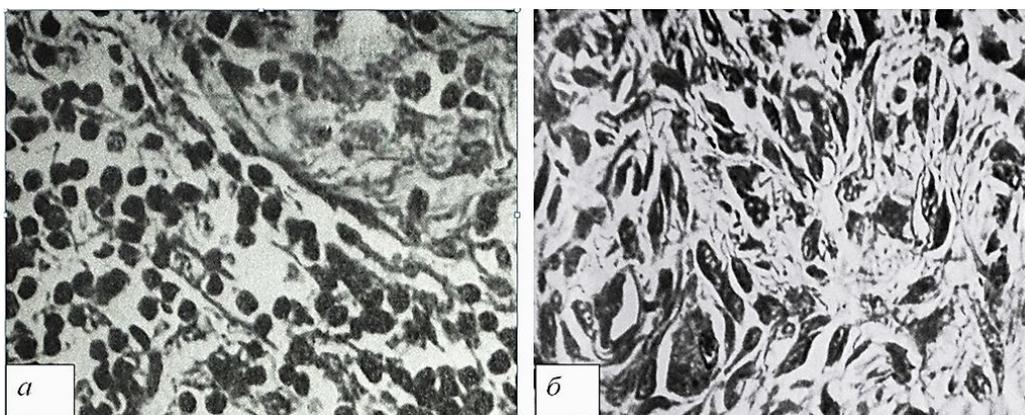


Рис. 1. Гистологический срез гранулезоклеточной опухоли (а) и текаклеточной опухоли (б) яичника крысы. Увеличение X400

Тека-клеточная опухоль овоидной формы, плотноэластической консистенции. На гистологических препаратах видны переплетающиеся пучки клеток, фибробластоподобной формы, либо эпителиоподобной формы (рис. 1б).

В препаратах клетки представлены разрозненно-расположенными голыми ядрами округлой или округло-удлиненной формы. Ядра многих клеток изогнуты, треугольной и неправильной

формы с зазубринами. Цитоплазма клеток вытянута, заострена на полюсах, без специфических включений.

Установлено, что развитие опухоли в организме спровоцировало увеличение числа погибших лейкоцитов на 270,8 % ($p < 0,05$) и снижение количества функционально полноценных клеток на 24,4 % ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2).

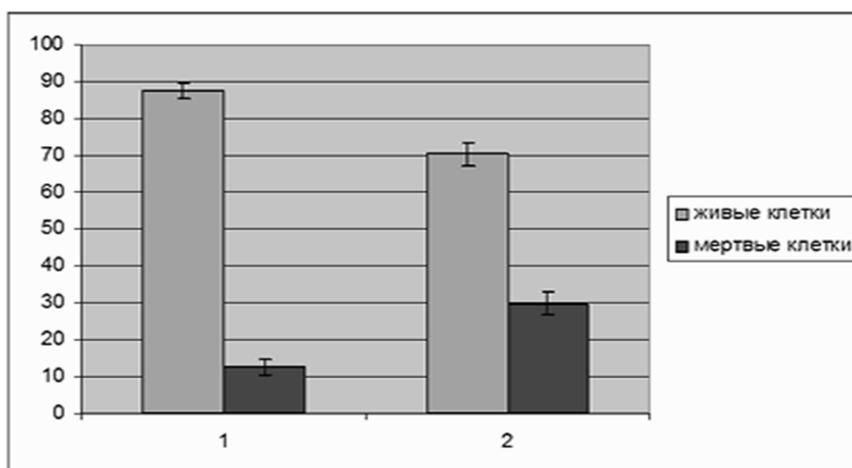


Рис. 2. Жизнеспособность лейкоцитов (%) 1-й контрольной и 2-й опытной группы крыс

В популяции форменных элементов крови, взятых из сосудов, питающих опухоль, были зафиксированы структурные неоднородности поверхности микрорельефа. В эритроцитах наблюдали утрату центрального просветления и наличие эхиноцитарной формы клеток. Выраженных различий в морфометрических параметрах эритроцитов между опытной и контрольной группами не выявлено (табл.).

В нейтрофилах опытной группы животных наблюдали сглаживание рельефа поверхности и уменьшение числа гранул.

Анализируя морфометрические параметры нейтрофилов в опытной группе животных, установили снижение объема нейтрофилов на 56,4 % ($p < 0,05$), на фоне незначительного возрастания площади поверхности.

Морфометрические параметры форменных элементов крови крыс

Группы	D, мкм	H, мкм	V, мкм ³	S, мкм ²
Эритроциты				
Контроль	5,67 ± 0,05	0,58 ± 0,01	20,96 ± 0,70	39,54 ± 1,53
Опыт	5,67 ± 0,08	0,58 ± 0,01	20,97 ± 0,65	43,48 ± 1,32
Нейтрофилы				
Контроль	10,15 ± 0,25	0,69 ± 0,05	61,34 ± 9,32	99,37 ± 9,4
Опыт	9,49 ± 0,22	0,60 ± 0,07	39,21 ± 4,81*	107,88 ± 7,13
Лимфоциты				
Контроль	6,89 ± 0,08	0,86 ± 0,04	27,20 ± 1,55	54,94 ± 3,07
Опыт	7,70 ± 0,24*	0,75 ± 0,01*	39,07 ± 2,21*	53,81 ± 2,17

* Статистическая значимость достоверности различий клеток крови в опытной группе животных по сравнению с данными в контрольной группе при $p < 0,05$.

Примечание. D – диаметр; H – высота; V – объем; S – площадь поверхности.

Не исключено, что изменения в морфологии нейтрофилов связаны с особенностями их локомоторной функции. По данным литературы при развитии опухолей в организме происходит изменение хемотаксической активности нейтрофилов, обусловленное продукцией низкомолекулярных факторов опухолевого перерождения, которые воздействуют на рецепторный аппарат клетки [3].

В рельефе поверхности лимфоцитов характерных особенностей при развитии опухолей не выявлено. Лимфоцитам было свойственно увеличение диаметра клеток 11,7 % ($p < 0,05$) на фоне снижения их высоты на 12,8 % ($p < 0,05$), при этом площадь поверхности возросла на 43,6 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В группе опытных животных установлена ярко выраженная реакция расплывания лимфоцитов, что вероятно связано с дефектами в структуре цитоскелета [4].

Диапазон значений упругости клеток крови при развитии опухолевого процесса существенно расширился от 10 до 30 Па, в то время как в контроле он находился в пределах 12–17 Па. Функционально активной была поверхность лимфоцитов и нейтрофилов. По данным АСС установлено снижение упругости лимфоцитов во всех точках наноидентификации в группе опытных животных. Снижение упругости в лимфоцитах по краю клетки на 42,7 % ($p < 0,05$) в группе крыс из экспериментальной группы свидетельствует о его лидерстве в механизмах направленной миграции к очагам иммунных реакций.

Модуль упругости поверхности нейтрофилов крыс опытной группы увеличился по краю клетки

в области гликокаликса на 107,4 % ($p < 0,05$), а также в области сегмента ядра, что указывает на повышение их способности адгезировать к сосудистой стенке. По данным литературы нейтрофилы первыми (на 10-е сутки после инокуляции опухолевых клеток) мигрируют к опухоли на ранних стадиях ее формирования [10], инфильтруют очаги опухолевого роста и становятся активными компонентами стромы [9].

Упругость поверхности эритроцитов опытной группы животных увеличилась во всех точках наноидентификации. По периферии эритроцита упругость возросла на 53,3 % ($p < 0,05$), а в области центрального углубления – на 59,2 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, что может быть связано с их активным участием в транспортных процессах и переносом на своей поверхности иммунных комплексов. Кроме того, одной из причин увеличения упругости мембран клеток крови, при злокачественном росте может быть изменение состава сфинголипидов, существенно влияющих на структуру липидного бислоя мембран. Уменьшение молярного соотношения церамиды/ганглиозида показано при опухолях яичников [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, функционально ведущими популяциями, отражающими развитие неопластических процессов в организме, являются лимфоциты и нейтрофилы. Упругость клеточной поверхности является диагностическим признаком ранних изменений в организме при развитии опухоли.

Расширение диапазона упругости поверхности клеток крови является маркером ранних изменений в организме сопровождающих развитие опухолевого перерождения тканей. Изменение геометрических параметров и «рисунка» рельефа поверхности клеток крови не является надежным диагностическим критерием, отражающим развитие опухолевого процесса в организме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берштейн Л.М. Гормональный канцерогенез // Природа. – 2000. – № 3. – С. 22–27.
2. Берштейн Л.М., Порошина Т.Е., Цырлина Е.В. Способ определения ДНК-повреждающей способности эстрогенов. Патент 2223503 (13) C2, МПК G01N33/74. № 2001101708/15; заявл. 17.01.2001.
3. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 6. – С. 467–474.
4. Ровенский Ю.А., Васильев Ю.М. Морфогенетические реакции клеток и их нарушения при опухолевой трансформации // Канцерогенез. – 2004. – С. 376–414.
5. Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Сладкова Е.А. Нанотехнологические подходы в изучении механических свойств клеточных поверхностей при стимуляции и блокаде аденорецепторов // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2010. – № 3. – С. 153–155.
6. Скоркина М.Ю., Чернявских С.Д., Федорова М.З. Влажная камера для исследования нативных клеток крови. Патент 98248 Российская федерация, МПК G01N 33/48 (2006.01). № 2010105541; заявл. 16.02.2010.
7. Brustmann H., Riss, Naude P.S. The relevance of angiogenesis in benign and malignant epithelial tumors of the ovary a quantitative histologic study // Gynec Oncol. – 1997. – Vol. 67. – P. 20–26.
8. Folkman J. Is Tissue Mass Regulated by Vascular Endothelial Cells? Prostate as the First Evidence // Endocrinology. – 1998. – Vol. 139, № 2. – P. 441–442.
9. Lightfoot A., Martin J., Amendola A. Fluorescent viability stains overestimate chondrocyte viability in osteoarticular allografts // The American Journal of Sports Medicine. – 2007. – Vol. 35, № 11. – P. 1817–1823.
10. Mueller M.M., Fusenig N.F. Friends or foes – bipolar effects of the tumor stroma in cancer // Nature Rev. Cancer. – 2004. – Vol. 4. – P. 839–849.

REFERENCES

1. Bershtein L.M. Hormonalnyi kancherogenez [Hormonal carcinogenesis]. Priroda [Nature], 2000, no. 3, pp. 22–27. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Bershtein L.M., Poroshina T.E. Sposob opredeleniya DNK-povrezhdayushei sposobnosti jestrogenov [The method for determining the DNA-damaging ability of estrogens]. Patent 2223503 (13) C2, MPK G01N33/74. № 2001101708/15, zayvl. 17.01.2001.
3. Malcheva V.N., Safonova V.G. Neodnoznachnost roli neutrofila v geneze opuholi [Ambiguity of the role of neutrophil in tumor genesis]. Tsitologiya [Cytology], 2009, Vol. 51, no. 6, pp. 467–474. (In Russ.; abstr. in Engl.).
4. Rovenskii Yu.A., Vasiliev Yu.M. Morfogeneticheskie reakcii kletok krovi i ih narusheniya pri opuholevoi transformachii [Morphogenetic reactions of cells and their disturbances in case of tumor transformation]. Kancherogenez [Carcinogenesis], 2004, pp. 376–414. (In Russ.; abstr. in Engl.).
5. Skorkina M.Yu., Fedorova M.Z., Sladkova E.A. Nanotehnologicheskie podhody v izuchenii mehanicheskikh svoystv kletochnykh poverhnostei pri stimuliyicii i blokade adenoreceptorov [Nanotechnological approaches in the study of the mechanical properties of cellular surfaces with stimulation and blockade of adenoreceptors]. Kletochnye tekhnologii v biologii i medicine [Cell Technologies in Biology and Medicine], 2010, no. 3, pp. 153–155. (In Russ.; abstr. in Engl.).
6. Skorkina M.Yu., Chernyvsikh S.D., Fedorova M.Z. Vlazhnaya kamera dly issledovaniy nativnykh kletok krovi [Wet chamber for the study of native blood cells]. Patent 98248 RF, MPK G01N 33/48 (2006.01). № 2010105541; zayvl. 16.02.2010.
7. Brustmann H., Riss, Naude P.S. The relevance of angiogenesis in benign and malignant epithelial tumors of the ovary a quantitative histologic study. Gynec Oncol., 1997, Vol. 67, pp. 20–26.
8. Folkman J. Is Tissue Mass Regulated by Vascular Endothelial Cells? Prostate as the First Evidence. Endocrinology, 1998, Vol. 139, no. 2, pp. 441–442.
9. Lightfoot A., Martin J., Amendola A. Fluorescent viability stains overestimate chondrocyte viability in osteoarticular allografts. The American Journal of Sports Medicine, 2007, Vol. 35, no. 11, pp. 1817–1823.
10. Mueller M.M., Fusenig N.F. Friends or foes – bipolar effects of the tumor stroma in cancer. Nature Rev. Cancer, 2004, Vol. 4, pp. 839–849.

Контактная информация

Сладкова Евгения Анатольевна – к. б. н., доцент кафедры биохимии медицинского института, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, e-mail: sladkova@bsu.edu.ru