

Е. В. Овсянко¹, А. В. Ефремов¹, П. М. Ларионов², Я. У. Овсянко¹

¹ Новосибирский государственный медицинский университет
Красный пр., 52, Новосибирск, 630091, Россия

² Новосибирский научно-исследовательский институт
травматологии и ортопедии
ул. Фрунзе, 17, Новосибирск, 630091, Россия

E-mail: vin_san92@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ОБЩЕЙ ГИПЕРТЕРМИИ НА АПОПТОЗ КЛЕТОК КАРЦИНОСАРКОМЫ WALKER 256

Проведено иммуногистохимическое исследование программируемой клеточной гибели в клетках карциносаркомы Walker 256 на 7-е и 14-е сут. после прививки в мышцу бедра в дозе 1×10^6 клеток крысам самцам линии Wistar при однократном воздействии общей гипертермией. Выявлен уровень экспрессии белков семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bax и Bad). Наблюдалась выраженная индукция апоптоза при воздействии общей гипертермии.

Ключевые слова: карциносаркома Walker 256, апоптоз, белки семейства Bcl-2, общая гипертермия.

Проблема регуляции клеточной пролиферации в нормальных и трансформированных клетках является одной из фундаментальных проблем медицины. В современных клинических и экспериментальных исследованиях при оценке эффективности и разработке противоопухолевой терапии уделяется внимание влиянию физических факторов на стимуляцию гибели опухолевых клеток, подавление их пролиферации. Важное значение для характеристики пролиферативной активности клеток, их выживаемости и возможностей индукции апоптоза имеет оценка отношения Bcl-2 / Bax. По современным представлениям это соотношение является ключевым фактором в регулировании апоптоза. Белки Bcl-2 и Bax находятся в состоянии постоянного динамического равновесия, они образуют как гомо-, так и гетеродимеры, что может приводить к развитию апоптоза клеток [1]. Считается, что низкое отношение Bcl-2 / Bax может обуславливать развитие апоптоза, в то время как при высоких показателях может отме-

чаться устойчивость клеток к апоптотическим стимулам [2].

Разные физические воздействия вызывают разную интенсивность изменений биологических свойств опухолей. Гипертермическая онкология представляет собой относительно новое, бурно развивающееся в последние 20–25 лет направление в лечении больных со злокачественными новообразованиями, связанное с применением высокой температуры (40–43 °С при общем воздействии и / или 42–47 °С – при локальном) для повышения эффективности комбинированной или комплексной терапии пациентов [3]. Одним из наиболее перспективных модифицирующих факторов химиотерапии является общая гипертермия [4]. Однако, несмотря на позитивные успехи в терапии, в составе опухолевых узлов остается определенный процент неповрежденных клеток, которые могут быть источником рецидивирования и метастазов. Причины устойчивости этих клеток нуждаются в рассмотрении их биологических, морфологических

и функциональных особенностей, таких как особенности пролиферативного потенциала, апоптоза клеточных структур. Поэтому необходимо провести морфологическое исследование опухолевого роста при включении в схему общей гипертермии с целью раскрытия структурно-функциональных особенностей взаимоотношений в новообразованиях после термальной терапии и определение роли структурных изменений в прогнозе эффекта лечения.

Цель исследования – в эксперименте с помощью иммуногистохимических методов изучить экспрессию белков семейства Bcl-2 в перевиваемой карциносаркоме Walker 256 при воздействии общей гипертермии.

Материал и методы

Использовали крыс самцов линии Wistar с массой тела 180–200 г. Работу с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией и директивами по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте [5; 6]. Использовали перевиваемый штамм опухоли Walker 256 (W256), поддерживаемый *in vivo*. Суспензию клеток перевиваемой карциносаркомы Walker 256 вводили животным в мышцу бедра в дозе 1×10^6 клеток в 0,1 мл изотонического раствора NaCl [7]. Через 5 сут. с момента прививки опухоли, когда ее объем достигал $2,51 \pm 0,42 \text{ см}^3$, животных разделяли на две группы: 1-я группа ($n = 14$) – контроль со спонтанным развитием опухоли; 2-я ($n = 14$) – животные при однократном воздействии общей гипертермией (ОГ) на 5-е сут. после трансплантации опухолевых клеток. Животных содержали при фиксированном световом режиме (свет / темнота – 1 : 1).

ОГ животных производилась в полном соответствии со «Способом экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных» [8]. Температурный режим нагрева горячей воды – теплоносителя подбирался экспериментально и составил $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Уровень ОГ, при котором прекращали разогрев, определялся ректальной температурой $43,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (стадия теплового удара). Время разогревания каждой особи до данной температуры было индивидуальным, не зависело от исходной температуры тела, массы животного

и составляло не более 17 мин. F. Meyer и соавт. [9] объясняют столь быстрое повышение температуры тела при разогревании в условиях 90–100 % влажности полным прекращением процесса испарения пота и отсутствием тем самым эффективного охлаждения [10].

Опухолевую ткань для иммуногистохимического исследования забирали в следующие сроки: у животных 1-й группы – после 5 сут. с момента прививки опухоли, у крыс 2-й группы – на 7-е и 14-е сут. с момента проведения ОГ.

Имуногистохимическое исследование уровня экспрессии белков семейства Bcl-2 выполняли на парафиновых срезах с помощью непрямого стрептавидин-авидинового метода [11]. Для выявления Bcl-2 и Bad в качестве первичных использовали мышиные моноклональные антитела («BD Biosciences», США) в разведении 1 : 100. Для выявления Вах применяли кроличьи поликлональные антитела к домену, играющему важную роль в образовании гомодимеров и гетеродимеров с антиапоптотическими членами семейства Bcl-2 («BD Biosciences», США). Срезы докрашивали гематоксилином и эозином. О специфическом связывании антител свидетельствовало выявляемое дисперсное мелкогранулярное окрашивание цитоплазмы клеток: от бледно-желтого до темно-коричневого цвета. Более интенсивное окрашивание соответствовало высокому содержанию антигенов в клетках.

Морфометрическое исследование производили на фотографических снимках при помощи моторизованного микроскопа M200 и камерой AxioCam HRC («Zeiss», Германия) с конечным увеличением $\times 630$. Подсчет осуществляли с помощью компьютерной программы Axio Vision 4.7.1 и блоком автоматических измерений (Auto measure). При подготовке программы использованы фильтр-маски Segmentation, Sigma. В программу вычислений вводилось значение процента площади позитивно окрашиваемых опухолевых элементов (тестовая площадь составляла $39\,437 \text{ мкм}^2$). Для каждой группы оценивалось по 40 изображений.

Полученные в экспериментах цифровые данные обрабатывали с использованием общепринятых методов статистики [12], уровень значимости отличий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение

Ранее в [13] указывалось, что при сравнительной оценке экспрессии белков семейства Bcl-2 при спонтанном развитии опухоли не выявлено достоверных отличий между величинами показателей Bcl-2 и Вах (см. таблицу). Уровень показателя экспрессии Bad был достоверно выше соответствующих величин показателей Bcl-2 и Вах в 1,64 и 1,7 раза соответственно. Возможно, апоптоз является фактором, сдерживающим рост опухоли на ранних стадиях развития. По наблюдениям I. D. Bowen, S. M. Bowen [14], в молодых опухолях на начальных стадиях развития происходит активация апоптоза, но с увеличением массы опухоли апоптоз резко падает и сохраняется на относительно стабильном уровне. При этом в карциносаркоме Walker 256 отношение Bcl-2 / Вах составило 1,04, а отношение Bcl-2 / Bad – 0,61.

При микроскопическом исследовании на протяжении всего эксперимента при воздействии ОГ в центре опухоли наблюдали обширный ишемический некроз, свидетельствующий об ее интенсивном росте. Участки жизнеспособной ткани сохранялись на периферии, прилежащей к капсуле. Солидный рост карциносаркомы W256 сопровождался преобладанием крупных, округлых светлых опухолевых клеток. Имелись значительно более редкие клетки, по одиночке и мелкими скоплениями с темными гиперхромными ядрами, с более узкой цитоплазмой в соотношении 1 : 200. Карциносаркома W256 при воздействии ОГ содержала значительное количество тонкостенных сосудов капиллярного типа, чаще с ветвящимися профи-

лями. К 14-м сут. после воздействия ОГ встречались немногочисленные профили зрелых крупных сосудов и нервов с оформленной стенкой. По периферии узла имелись единичные соматические мышечные волокна, подвергавшиеся литическим превращениям. Отмечалась инвазия опухолевых клеток в мышечные волокна с резорбцией саркоплазмы. В центральной зоне и по периферии регистрировались очаги некроза опухолевых клеток, различающиеся по размерам.

По данным количественного анализа интенсивности иммуногистохимических реакций, при воздействии ОГ на протяжении всего эксперимента резко возрастал уровень экспрессии промоторов апоптоза Вах и Bad, инициирующих программируемую клеточную смерть в присутствии ингибиторов каспаз. Уровень экспрессии Bad через 7 и 14 сут. после воздействия ОГ был выше уровня при «спонтанном» развитии опухоли в 2,1 и 2,2 раза соответственно (см. таблицу). Экспрессия проапоптогенного белка Вах через 7 и 14 сут. была также выше соответствующего показателя в контроле в 3,7 и 1,7 раза соответственно (см. таблицу). Уровень экспрессии антиапоптогенного белка Bcl-2 после ОГ был ниже на протяжении всего эксперимента, чем у животных со «спонтанным» развитием опухоли, в большей степени на 14-е сут. эксперимента (в 2,2 раза). Отношение Bcl-2 / Вах через 7 сут. эксперимента снижалось до 0,18, а Bcl-2 / Bad – до 0,19, т. е. эти отношения были уменьшены на 83 и 69 % по сравнению со «спонтанным» ростом опухоли. Через 14 сут. отношение Bcl-2 / Вах составляло 0,27, а Bcl-2 / Bad – 0,13, т. е. эти отношения были уменьшены соответственно на 74 и 79 %.

Показатели уровня экспрессии белков семейства Bcl-2 у крыс линии Wistar с перевиваемой карциносаркомой Walker 256 при воздействии общей гипертермией, %
($M \pm m$)

Группа	Срок наблюдения, сут.	Белок		
		Bcl-2	Вах	Bad
1-я	5	19,86 ± 1,52	19,13 ± 2,05	32,59 ± 1,81
2-я	7	13,06 ± 1,48 *	71,52 ± 4,49 *	68,06 ± 3,58 *
	14	8,91 ± 1,41 *	33,47 ± 1,59 *	70,58 ± 1,95 *

Примечание: * – достоверность отличия показателей по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Ранее обнаружено [15], что при воздействии ОГ на крыс линии Wistar с переносимой карциносаркомой Walker 256 отмечается повышенное содержание на 14-е сутки ТБК-активных продуктов, уровня диеновых конъюгатов, а также увеличение активности лизосомных ферментов (арилсульфатазы А- и N-ацетил-β, D-глюкозамидазы) в сыворотке крови, свидетельствующее о стимуляции окислительного стресса, индуцирующего гибель клеток Walker 256 путем апоптоза. Важно отметить, что уровень экспрессии протоонкогена Bcl-2 при воздействии ОГ на протяжении всего эксперимента достоверно ниже соответствующего показателя контроля у животных со спонтанным развитием опухоли, в большей степени на 14-е сутки эксперимента в 1,52 и 2,23 раза соответственно.

Заключение

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что члены семейства белков Bcl-2 непрерывно взаимодействуют друг с другом, находясь в динамическом равновесии между гомо- и гетеродимерами. Показано, что решающим моментом в запуске апоптоза карциносаркомы Walker 256, вероятно, является гетеродимеризация белков семейства Bcl-2. Выявлена выраженная индукция апоптоза при воздействии общей гипертермии.

Список литературы

1. Chinaiyan A. M. Molecular Ordering of the Cell Death Pathway – Bcl-2 and Bcl-X (L) function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 4573–4576.
2. Vaskivuo T. E., Ottander U., Oduwole O., Isomaa V., Vihko P., Olofsson L., Tapanainen J. S. Role of Apoptosis, Apoptosis-related Factors and 17β-hydroxysteroid dehydrogenases in Human Corpus Luteum Regression // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002. Vol. 194, № 1–2. P. 191–200.
3. Фрадкин С. З. Современное состояние гипертермической онкологии и тенденции ее развития // *Мед. новости.* 2004. № 3. С. 3–8.
4. Исмаил-заде Р. С. Использование общей управляемой гипертермии в лечении генерализованных опухолей у детей // *Рос. онкол. журн.* 2004. № 6. С. 23–26.
5. Council Directive of 24 November 1986 on the Approximation of Laws, Regulations of the Member States Regarding the Protection of Animals Used for Experimental and Other Purposes Directive (86/609/EEC) // *Official Journal of the European Communities.* 1986. Vol. 262. P. 1–29.
6. Руководящие принципы ухода за животными и их использования в эксперименте // *Журн. высш. нервн. деятельности им. И. П. Павлова.* 1990. № 1. С. 203.
7. Хегай И. И., Попова Н. А., Ганилова Л. С., Шнайдер Е. П., Иванова Л. Н. Динамика опухолевого роста у крыс линии Brattleboro и Wag при введении разных доз карциносаркомы Walker 256 // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 2008. Т. 145, № 1. С. 88–90.
8. Ефремов А. В., Пахомова Ю. В., Пахомов Е. А., Шорина Г. Н., Ибрагимов Р. Ш. Способ экспериментального моделирования общей гипертермии у мелких лабораторных животных // *Патент России № 2165105.* 2001. Бюл. № 10.
9. Meyer F., Bar-Or O., McDougal D. Sweat Electrolyte Loss During Exercise in the Heat Effects of Gender and Naturation // *Med. Sci. Sports Exerc.* 1992. Vol. 24. P. 776–781.
10. Monte O., Zyngier S., Kimura E. T., Bianco A. C. Dopaminergic and Somatostatinergic Pathways Decrease Serum Thyrotropin in Rats Bearing the 256-Walker Mammary Carcinoma // *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 2005. Vol. 49, № 2. P. 253–264.
11. Эллиниди В. Н., Аникиева Н. В., Максимова Н. А. Практическая иммуногистохимия. СПб., 2002.
12. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., 1999.
13. Овсянко Е. В., Ефремов А. В., Лушикова Е. Л., Ларионов П. М., Архипов С. А., Непомнящих Л. М., Овсянко Я. У. Иммуногистохимический анализ программируемой гибели клеток карциносаркомы Walker 256 при воздействии цитостатическими препаратами // *Бюл. эксп. биол. и медицины.* 2009. № 10. С. 455–460.
14. Bowen I. D., Bowen S. M. Programmed Cell Death in Tumours and Tissues. L., 1990.

15. Пупышев А. Б., Федина Р. Г., Мичурина С. В., Овсянко Е. В., Ефремов А. В. Эффект общей управляемой гипертермии на содержание продуктов липидпероксидации и активность лизосомных ферментов в сы-

воротке крови у крыс с карциносаркомой Walker 256 // *Вопр. онкологии*. 2009. № 2. С. 221–223.

Материал поступил в редколлегию 16.09.2011

E. V. Ovsyanko, A. V. Efremov, P. M. Larionov, Ya. U. Ovsyanko

INFLUENCE OF THE TOTAL HYPERTHERMIA ON PROGRAMMED CELLULAR DESTRUCTION OF CARCINOSARCOMA WALKER 256

A immunohistochemical study of programmed cell death in cells of carcinosarcoma Walker 256 on the 7 and 14 day after inoculation in the thigh muscle at a dose of 1×10^6 cells of male Wistar rats, single exposure total hyperthermia. Revealed the expression of proteins Bcl-2 family (Bcl-2, Bax and Bad). There was a marked induction of apoptosis when exposed to a total of hyperthermia.

Keywords: carcinosarcoma Walker 256, apoptosis proteins Bcl-2 family, total hyperthermia.