

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НИЗКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ

Макарова В.В., Таскаева Ю.С., Бгатова Н.П.

*Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии
– филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия*

Актуальность работы. Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является крайне гетерогенным злокачественным новообразованием. Известно, что ГЦК характеризуется наличием морфологической, иммунофенотипической и генетической гетерогенности. Было показано, что гистологическая гетерогенность в ГЦК сопровождается повышением пролиферативной активности опухолевых клеток. Наиболее изученным на ультраструктурном уровне является хорошо дифференцированный тип ГЦК. Различные субклоны в пределах одного новообразования существуют в специфическом опухолевом микроокружении, формируя уникальные клональные фенотипы, и, соответственно, могут проявлять различную чувствительность к проводимой терапии и формировать различную устойчивость к лекарственным препаратам. Углубленное исследование различных типов ГЦК может способствовать развитию эффективной таргетной терапии.

Цель работы. Изучение ультраструктуры плохо дифференцированного типа ГЦК и оценке ее морфологической гетерогенности на субклеточном уровне.

Материалы и методы. В эксперименте использовали мышей-самцов линии СВА в возрасте 6–8 недель, массой 18–20 г. Для индукции опухолевого процесса использовали клетки гепатокарциномы-29 (ГК-29). ГК-29 была получена и верифицирована сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН. Суспензию клеток ГК-29 вводили интактным животным в мышцу правого бедра. Биологический материал забирали на 23 сутки эксперимента. Для электронно-микроскопического исследования образцы ткани фиксировали в 4% растворе параформальдегида и в 1% растворе OsO_4 , дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон; полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали толуидиновым синим и изучали под световым микроскопом; ультратонкие срезы толщиной 70-100 нм контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе. Морфометрический анализ проведен на 100 клетках Г-29, отобранных случайным образом и содержащих ядро и отчетливую непрерывную клеточную мембрану.

Результаты. Имплантированная опухоль представляла собой плохо дифференцированный тип ГЦК, внутри которого выявлялись сосуды, схожие с синусоидами печени (Рис.1).

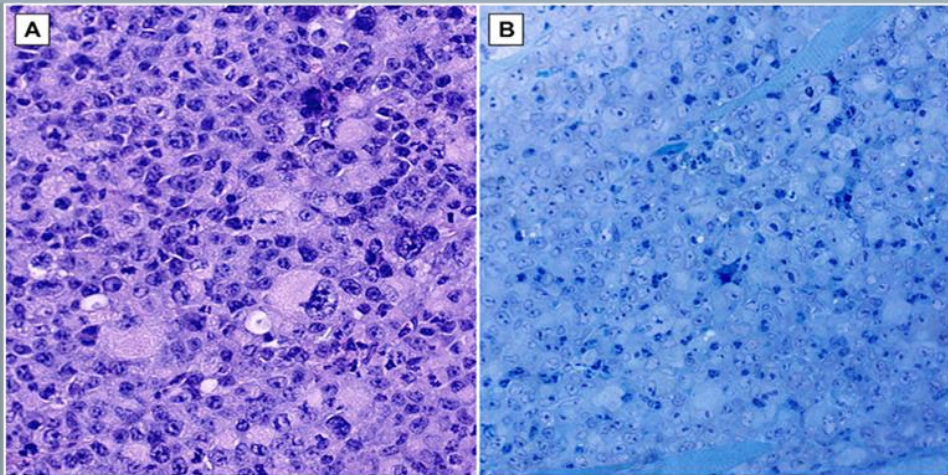


Рис.1 Морфология плохо дифференцированной ГЦК.
А - гематоксилин-эозин, х400; В - толуидиновый синий, х400.

Среди опухолевых клеток встречались гигантские клетки, в том числе многоядерные. Клетки Г-29 отличались структурным полиморфизмом: размерами ядра и цитоплазмы, ядерно-цитоплазматическим соотношением, концентрацией субклеточных компонентов. Ядра клеток были крупными, имели неправильную форму и неравномерное распределение хроматина. Ядрышки встречались редко (Рис.2 А-D). Клетки в трабекулах располагались плотно и, изредка, образовывали в зонах контакта микроворсинки (Рис.2 Е, F). Внутриклеточное содержимое в клетках ГЦК было достаточно разнообразным. Количество и размеры митохондрий, как и гЭПР значительно варьировали, имелось множество свободных рибосом и полисомальных комплексов. Включения гликогена были редкими.

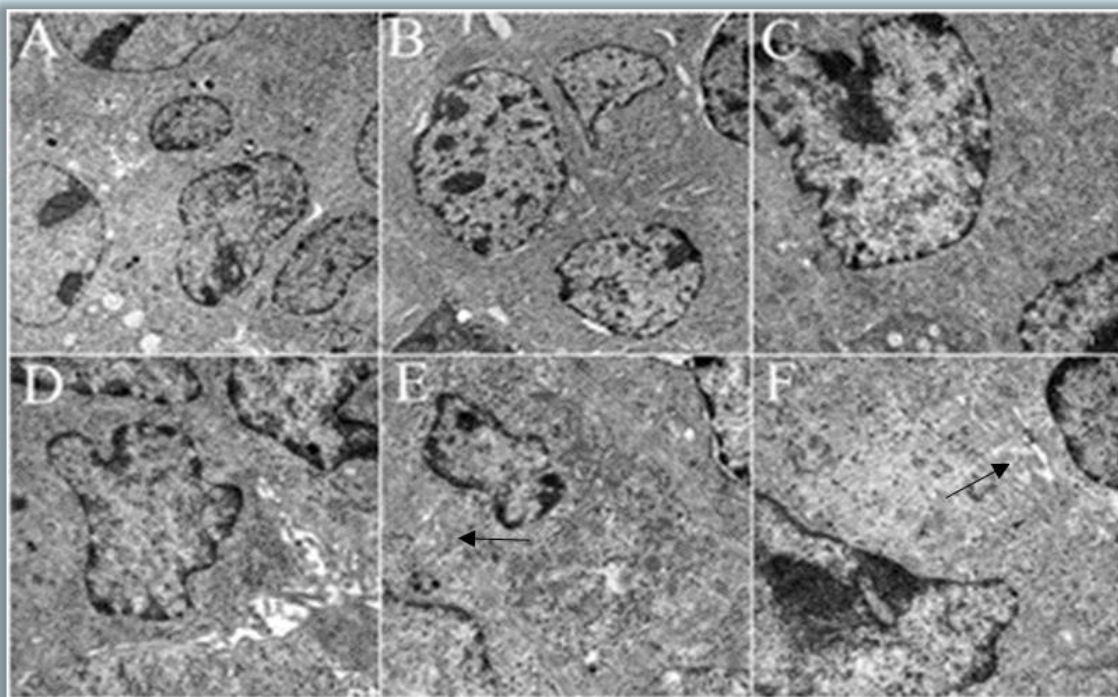


Рис.2 Структурная неоднородность клеток (ГЦК). Вариабельность значения ядерно-цитоплазматических соотношений в опухолевых клетках (А, В); ядерный полиморфизм (С, D); нарушения в организации цитоплазматических компонентов ГЦК, микроворсинки (стрелки) между соседними опухолевыми клетками (Е, F).

Также, в опухолевых клетках достаточно часто встречались структуры, связанные с аутофагией (рис. 4). Аутофагосомы были редкими и содержали в себе цитоплазматическое содержимое – участки ЭПР и рибосом (рис. 4В, С). Аутолизосомы встречались чаще, содержали гетерогенное содержимое на различных этапах деградации (рис. 4D, E). Лизосомы встречались редко (рис. 4F)

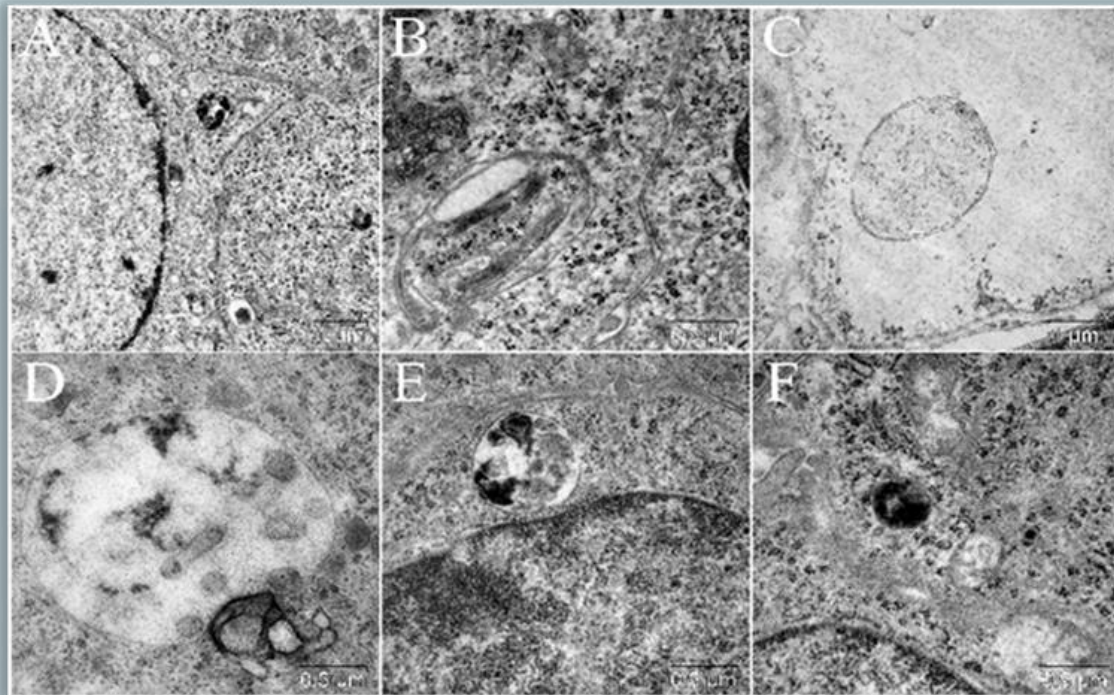


Рис.3 Аутофагия в ГЦК. В опухолевых клетках присутствовали ранние и поздние аутофагические структуры (А). Формирующаяся аутофагосома (АР, В). Гигантская аутофагосома в лизированном участке цитоплазмы клетки (АР, С). Ранняя аутолизосома с гетерогенным, частично идентифицируемым содержимым (AL, D). Поздняя аутолизосома, содержащая гетерогенный, частично переваренный материал (AL, E). Лизосома с гомогенным, электронно-плотным содержимым (Lys, F).

В опухоли были идентифицированы кровеносные и лимфатические сосуды (Рис.4). Однако эндотелиальные клетки таких кровеносных микрососудов не имели фенестр, и представляли собой эндотелий «непрерывного» типа. Также, изредка, встречались кровеносные сосуды с большим внутрипросветным диаметром, состоящие из нескольких эндотелиальных клеток, имеющие низкое содержание органелл и локальные истончения эндотелия. Были выявлены ультраструктурные признаки васкулогенной мимикрии внутриопухолевых сосудов. Такие сосуды были частично образованы эндотелиальными клетками и, частично, опухолевыми клетками. Лимфатические сосуды имели типичную морфологию, были немногочисленны, и, узкими извитыми каналами проходили в перитуморальной зоне.

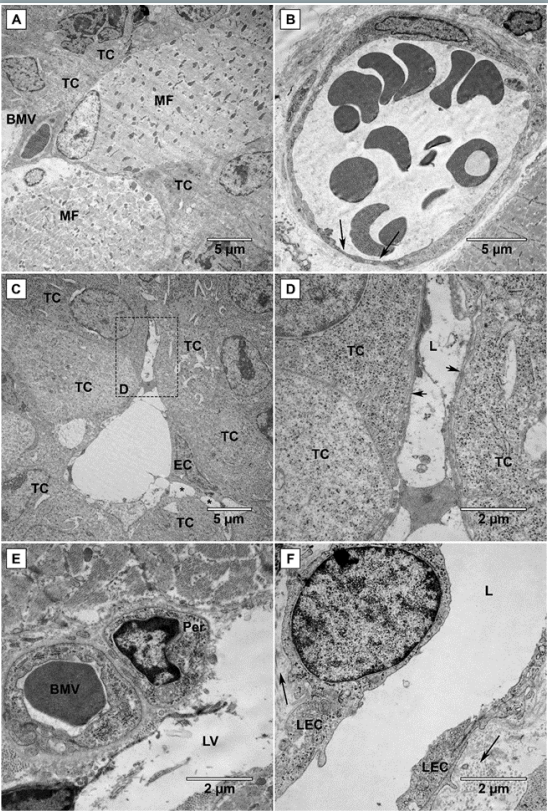


Рис.4 Сосудистое русло гепатоцеллюлярной карциномы. А - кровеносный микрососуд (BMV) на границе инвазии опухолевых клеток (TC) в мышцу бедра (MF); В - перитуморальный гигантский материнский сосуд с локально истонченным эндотелием; С - васкулогенная мимикрия: часть стенки образована эндотелиальными клетками (EC), часть – опухолевыми клетками; D - увеличение с С: просвет сосуда отделен тонким слоем экстрацеллюлярного матрикса (стрелки) и лежащей за ним опухолевой клеткой; E - кровеносный микрососуд с микровыростами на люминальной поверхности, перицит (Per) и лимфатический сосуд (LV) в перитуморальной зоне; F - лимфатические эндотелиальные клетки (LEC) выстилающие лимфатический сосуд в перитуморальной зоне, якорные филаменты (стрелки), во внесосудистом пространстве.

Ядерно-цитоплазматический индекс значительно варьировал среди опухолевых клеток. По величине ЯЦИ все клетки были разделены на 5 типов : I тип– ЯЦИ более 0.4, II тип – 0.3-0.4, III типа – 0.2-0.3, IV типа – 0.1-0.2, V типа – 0-0.1. Среднее значение ЯЦИ для клеток I, II и III типа составило 0.72, для клеток IV и V типа – 0.14 ($p < 0.0005$). Клетки I-III типа составляли 89% от общего числа. Объемная плотность ЭПР была значительно выше в клетках I-III типов ($p < 0.05$). Интересно, что клетки, имеющие структуры, связанные с аутофагией, составляли 48% от общего числа. При этом аутолизосом было значительно больше в клетках IV и V типа ($p < 0.05$). В то же время, количество и размеры аутофагосом и лизосом во всех клетках было примерно одинаковым (Рис.5).

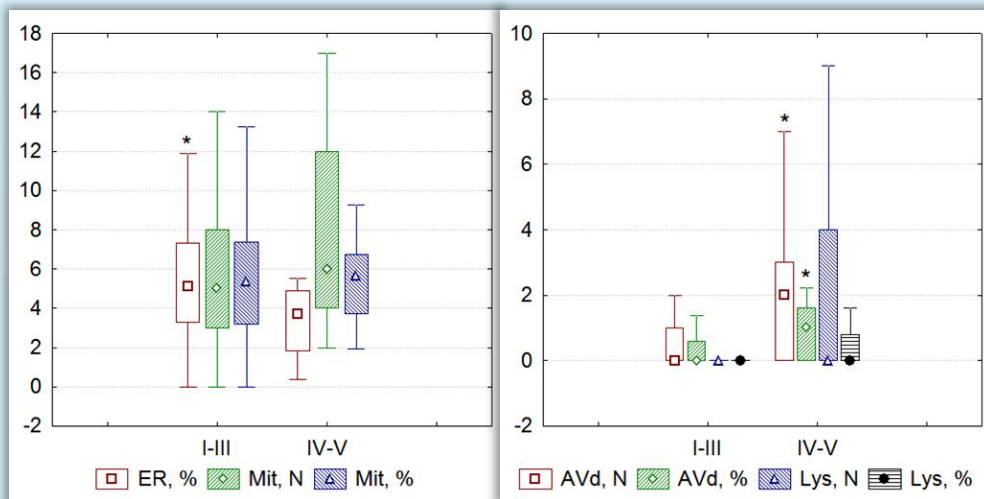


Рис.5 Статистический анализ. ER,% – объемная плотность ЭПР; Mit,N – численная плотность митохондрий; Mit,% – объемная плотность митохондрий; Avd, N – численная плотность аутолизосом; Avd, % – объемная плотность аутолизосом; Lys, N – численная плотность лизосом; Lys, % – объемная плотность лизосом; * - $P < 0.05$;

Выводы. В данном исследовании представлены ультраструктурные основы формирования значимых патологических процессов в низко дифференцированном типе ГЦК. Несмотря на достигнутые успехи, ГЦК остается одним из самых летальных типов рака, который плохо поддается лечению. Точные механизмы патогенеза ВМ не ясны, и дальнейшее изучение ВМ в ГЦК, учитывая ее патологическую гиперваскуляризацию, представляет собой особую терапевтическую значимость.