

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616-006.66+616.34-006.6

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-2-222-228>

Поступила в редакцию 24.01.2018

Received 24.01.2018

М. А. Деревянко¹, С. Н. Рябцева², М. В. Фридман³, И. А. Деревянко¹, И. В. Залуцкий¹

¹Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

³Минский городской клинический онкологический диспансер, Минск, Республика Беларусь

МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМАХ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Аннотация. В работе применен электронно-микроскопический метод для анализа клеток стромального компонента рака толстой кишки. В ходе исследования обнаружены клетки гематогенного и мезенхимального происхождения с измененными ультраструктурами.

Ключевые слова: колоректальный рак, стромальное микроокружение, ультраструктурное исследование

Для цитирования: Микроокружение опухолевых клеток при аденокарциномах толстой кишки / М. А. Деревянко [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2018. – Т. 15, № 2. – С. 222–228. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-2-222-228>

М. А. Derevyanko¹, S. N. Rjabceva², M. V. Fridman³, I. A. Derevyanko¹, I. V. Zalutskii¹

¹Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

³Minsk City Clinical Oncology Center, Minsk, Republic of Belarus

MICROENVIRONMENT OF TUMOR CELLS IN COLON ADENOCARCINOMAS

Abstract. An electron microscopic method for analyzing the cells of the stromal component of colon cancer has been applied. During the study, cells of hematogenous and mesenchymal origin with altered ultrastructures were found.

Keywords: colorectal cancer, stromal microenvironment

For citation: Derevyanko M. A., Rjabceva S. N., Fridman M. V., Derevyanko I. A., Zalutskii I. V. Microenvironment of tumor cells in colon adenocarcinomas. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya meditsinskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2018, vol. 15, no. 2, pp. 222–228 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-2-222-228>

Введение. Колоректальный рак (КРР), или рак толстой кишки, занимает 3-е место в мире по частоте среди всех злокачественных опухолей. Согласно данным литературы последних лет наблюдается неуклонный рост заболеваемости КРР во всем мире. Ежегодно регистрируют более 1 млн пациентов с КРР и около 700 тыс. смертей от него [1]. В течение последних десятилетий в Республике Беларусь отмечается стойкий рост заболеваемости КРР. Рак толстой кишки вышел на 1-е место в структуре онкологической заболеваемости населения г. Минска, на 3–4-е место по стране и характеризуется высокими показателями смертности [2, 3].

Полученные в последние десятилетия данные показывают, что распространение злокачественных новообразований зависит не только от свойств раковых клеток, но и от стромального микроокружения опухоли, которое включает межклеточный матрикс, кровеносные сосуды, клетки воспалительного инфильтрата и фибробласты [4, 5]. Следует отметить, что клетки стромы не являются злокачественными и служат для поддержания нормальной структуры и функции тканей. Однако изменение взаиморегуляции между структурными элементами паренхимы и стромы приводит к тому, что нормальные клетки стромы приобретают патологический фенотип, что содействует росту и распространению опухоли [4, 6]. Важная роль стромального компонента в канцерогенезе диктует необходимость поиска стромальных факторов прогноза течения КРР, выяснения особенностей клеток и внеклеточных структур соединительной ткани, что позволит оптимизировать прогноз течения заболевания и изучить чувствительность опухоли на применяемые методы терапии [6, 7].

Цель работы – изучить ультраструктурные особенности клеток стромального микроокружения в ткани при колоректальном раке.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования послужили фрагменты ткани опухоли 23 пациентов (возраст от 39 до 85 лет), оперированных по поводу рака толстой кишки. При гистологическом исследовании у всех обследуемых верифицирована аденокарцинома различной степени дифференцировки. В зависимости от стадии заболевания и распространения опухолевого процесса пациенты были разделены на три группы исследования:

группа 1 ($n = 9$) – пациенты с местно-распространенным КРР (стадия 1–2, $pT_{1-4}N_0M_0$).

группа 2 ($n = 10$) – пациенты с локально-регионарным КРР (наличие метастатического поражения региональных лимфатических узлов; стадия 3, $pT_{1-4}N_{1-2}M_0$).

группа 3 ($n = 4$) – пациенты с диссеминированным КРР (метастатическое поражение региональных лимфатических узлов и отдаленных органов/печень; стадия 4, $pT_{1-4}N_{1-2}M_1$).

Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в 2,5 %-ном растворе глутарового альдегида, а затем в 2 %-ном растворе четырехоксида осмия. В дальнейшем ткань обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, пропитывали в смеси эпоксидных смол и заключали в блоки по стандартной методике. Полимеризацию блоков проводили в термостате при 37 °С в течение 2 сут, в последующие 4 сут – при 56 °С. Из полученных блоков на ультрамикротоме ЛКВ (Швеция) изготавливали ультратонкие срезы, монтировали их на сеточки и после контрастирования цитратом свинца изучали под электронным микроскопом JEM-100В (Япония).

Результаты и их обсуждение. Электронно-микроскопическое исследование выявило присутствие в строме опухоли большого количества клеток фибробластического ряда различной структурной и функциональной зрелости. Преобладающая популяция фибробластов представлена крупными отросчатыми, веретеновидными или распластанными клетками – активированными фибробластами (рис. 1, *a*) с очень высокой метаболической активностью, о чем свидетельствует гиперплазия и дилатация компонентов гранулярной эндоплазматической сети (гЭПС). Такая ультраструктура гранулярной сети характерна для клеток, активно синтезирующих белок «на экспорт». Митохондрии – крупные, часто с просветленным матриксом, что указывает на высокий уровень функциональной активности клетки, на превышение уровня расхода энергии над уровнем синтеза. Отмечался полиморфизм ядер – от типичной овальной формы до причудливой, более характерной для злокачественных клеток (рис. 1, *b*).

Фибробласты с выраженной коллагенообразовательной активностью располагались вблизи кровеносных сосудов, частично формируя их стенку, а также группами в массе межклеточного материала, контактируя клеточными поверхностями с сохранением контуров цитопламати-

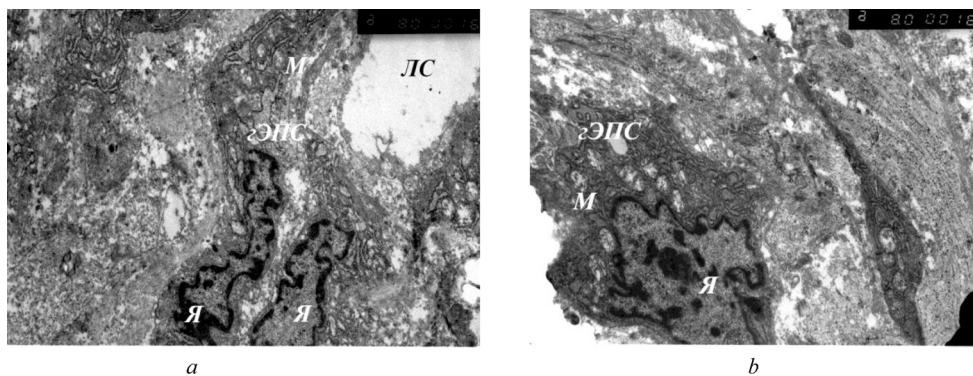


Рис. 1. Фибробласты стромального микроокружения КРР: *a* – активированные фибробласты ($\times 8000$); *b* – фибробластоподобная клетка с атипичным ядром: крупные ядра таких клеток имеют многочисленные инвазии кариолеммы ($\times 8000$). гЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть, ЛС – лимфатический сосуд, М – митохондрии, Я – ядро

Fig. 1. Fibroblasts of the colorectal cancer stromal microenvironment: *a* – activated fibroblasts ($\times 8000$); *b* – fibroblast-like cell with an atypical nucleus: large nuclei of such cells have numerous invasions of karyomemba ($\times 8000$). гЭПС – granular endoplasmic reticulum, ЛС – lymphatic vessel, М – mitochondria, Я – nucleus

ческих мембран между собой и другими клетками стромального микроокружения. Фибробластоподобные клетки с большими уродливыми ядрами обнаруживались как одиночные элементы среди массы деструктивно-измененного внеклеточного матрикса. Предположительно, подобные клетки претерпели эпителиально-мезенхимальную трансформацию и могут быть оценены как пул мигрирующих клеток.

Также в микроокружении замечены крупные вытянутой формы клетки, у которых наряду с типичными компонентами активированного фибробласта выявлялись пучки параллельно расположенных миофиламентов, проходящие по периферии цитоплазмы (рис. 2). Подобная ультраструктура отражает сократительные свойства клетки, вместе с тем сохраняя свойства синтезировать и секретировать структурные макромолекулы. Кроме того, наблюдался контакт поверхностных участков цитоплазмы данных клеток с волокнами внеклеточного матрикса, что, по мнению ряда авторов, расценивается как фибронексус [8] и рассматривается как характерный признак миофибробластов [9].

В опухолевом микроокружении помимо фибробластов встречались макрофаги, при этом нами обнаружено две их популяции. Первая популяция: клетки с характерными чертами классических макрофагов (округлая или амебовидная форма, без многочисленных цитоплазматических выростов, с присутствием в цитоплазме лизосом и фагосом), что свидетельствует об их функциональной активности, связанной с фагоцитозом (рис. 3, *a*). Вторая популяция: клетки с многочисленными цитоплазматическими выпячиваниями, по типу филоподий. В них практически не выявлялся или обнаруживался в очень небольшом количестве внутрицитоплазматический фагоцитарный материал (рис. 3, *b*). Отсутствие ультраструктурных признаков фагоцитоза в этих клетках может свидетельствовать о нарушении процессинга опухолевых антигенов, поскольку в норме фагоцитоз является основным путем накопления антигенов, используемых для антигенпрезентации макрофагами.

И первая, и вторая популяции макрофагов находились в непосредственной близости к опухолевым клеткам. Однако макрофаги второй популяции кроме формирования контактов с опухолевыми клетками в группе с диссеминированным КРР, где они были преобладающей популяцией, формировали плотные контакты с фибробластами. В зонах инвазии опухоли в мышечную оболочку данные макрофаги устанавливали контакты друг с другом (рис. 3, *c*), а в периферических участках цитоплазмы клеток были выявлены лизосомы, что может свидетельствовать

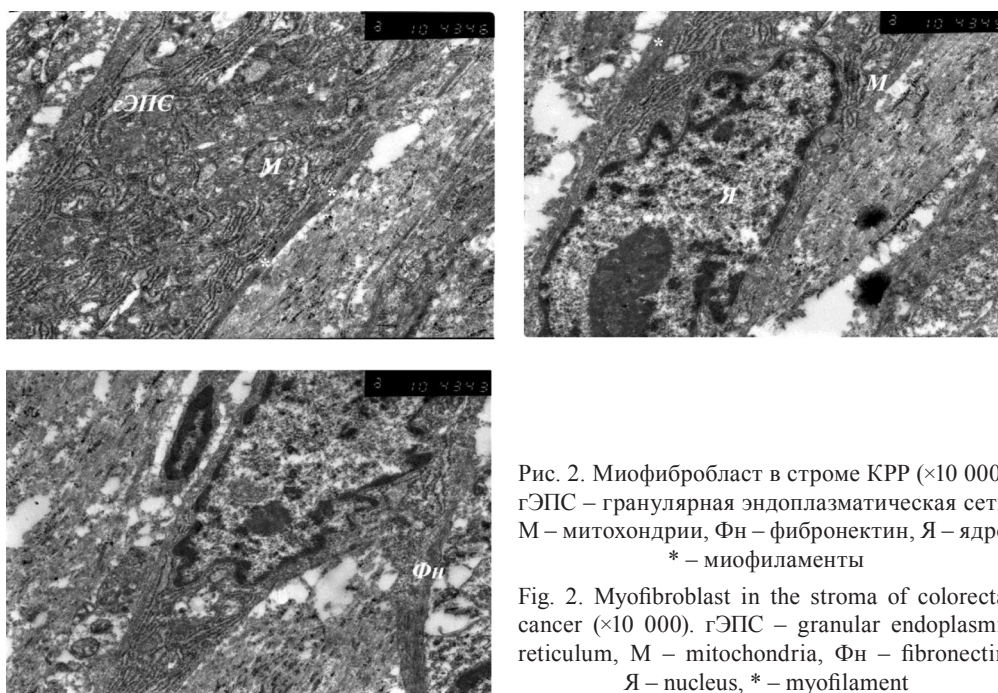


Рис. 2. Миофибробласт в строме КРР ($\times 10\,000$). гЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть, М – митохондрии, Фн – фибронектин, Я – ядро, * – миофиламенты

Fig. 2. Myofibroblast in the stroma of colorectal cancer ($\times 10\,000$). гЭПС – granular endoplasmic reticulum, М – mitochondria, Фн – fibronectin, Я – nucleus, * – myofilament

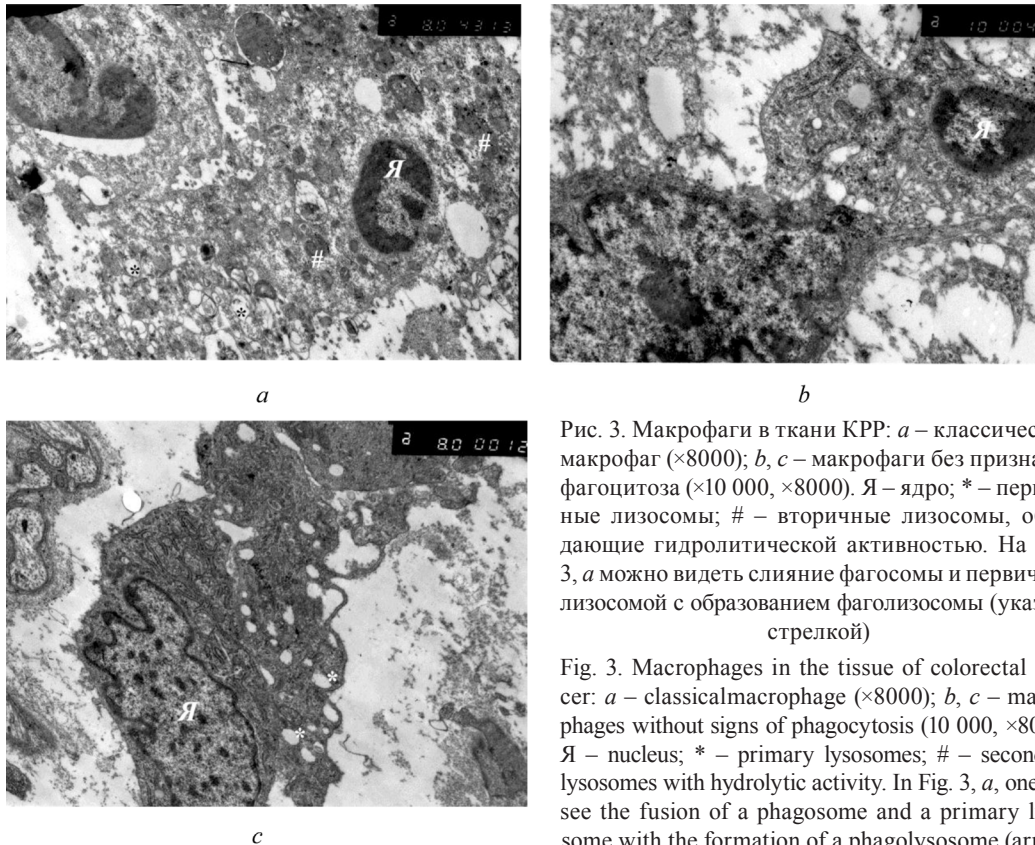


Рис. 3. Макрофаги в ткани КРР: *a* – классический макрофаг ($\times 8000$); *b, c* – макрофаги без признаков фагоцитоза ($\times 10\,000$, $\times 8000$). Я – ядро; * – первичные лизосомы; # – вторичные лизосомы, обладающие гидролитической активностью. На рис. 3, *a* можно видеть слияние фагосомы и первичной лизосомой с образованием фаголизосомы (указано стрелкой)

Fig. 3. Macrophages in the tissue of colorectal cancer: *a* – classical macrophage ($\times 8000$); *b, c* – macrophages without signs of phagocytosis ($10\,000$, $\times 8000$). Я – nucleus; * – primary lysosomes; # – secondary lysosomes with hydrolytic activity. In Fig. 3, *a*, one can see the fusion of a phagosome and a primary lysosome with the formation of a phagolysosome (arrow)

о высвобождении их содержимого во внеклеточное пространство и об участии в ремоделировании внеклеточного матрикса, содействуя опухолевой инвазии.

Характерным признаком КРР во всех группах исследования стала выраженная инфильтрация стромы плазматическими клетками. В группе с местным распространением рака преобладали плазмциты зрелого типа (рис. 4, *a*), цитоплазма таких клеток заполнена длинными уплощенными концентрическими рядами гранулярной сети. Единичные относительно крупные митохондрии в некоторых клетках имели просветленный матрикс и смещались в поверхностные участки клетки. Комплекс Гольджи развит относительно слабо, при большом увеличении можно было различить единичные уплощенные мешочки и многочисленные мелкие везикулы, часть которых содержала электронноплотный материал.

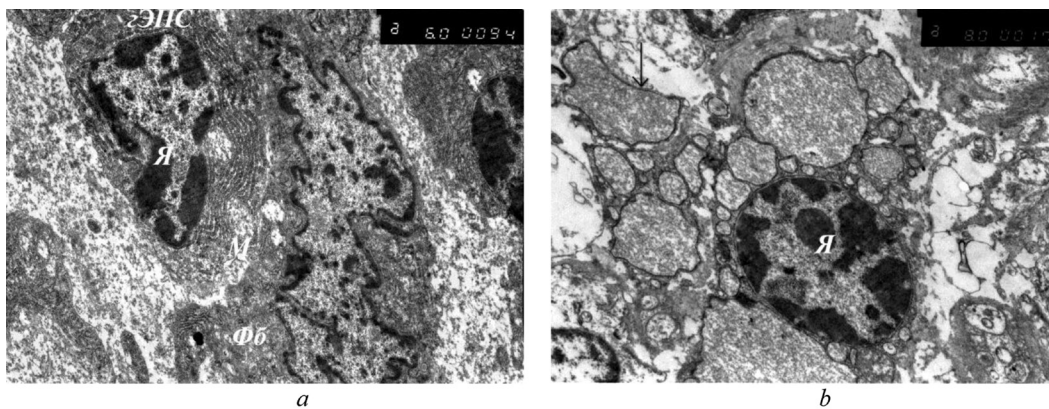


Рис. 4. Инфильтрация стромы КРР плазматическими клетками: *a* – контакт зрелого плазмцита с фибробластом (Фб); *b* – атипичная плазматическая клетка. Я – ядро, М – митохондрии, гЭПС – гранулярная эндоплазматическая сеть, плазматомоз (указан стрелкой)

Fig. 4. Infiltration of the stroma of colorectal cancer by plasma cells: *a* – contact of mature plasmocyte with fibroblast (Фб); *b* – atypical plasma cell. Я – nucleus, М – mitochondria, гЭПС – granular endoplasmic reticulum, plasmotomosis (arrow)

В группе с диссеминированным распространением КРР встречались преимущественно плазмоциты с чрезвычайно растянутыми цистернами гранулярной эндоплазматической сети, заполненные хлопьевидным материалом и занимающие практически всю цитоплазму. Другие клеточные органеллы не обнаружены. Границы цитоплазматической мембраны были трудно различимы (рис. 4, *b*). При этом наблюдался отрыв фрагментов цитоплазмы с внутриклеточным содержимым в окружающее пространство. Наличие атипичных плазматических клеток с растянутыми элементами гранулярной эндоплазматической сети, заполненных хлопьевидным материалом, свидетельствует о том, что органеллы, участвующие в секреции иммуноглобулинов, не активны. По-видимому, выделение содержимого осуществляется вследствие фрагментации клетки, обусловленной прогрессирующим растяжением гранулярной эндоплазматической сети.

Плазмоциты чаще всего выявлялись среди массы клеток стромального окружения: фибробластов, макрофагов и лимфоцитов, при этом в местах межклеточных контактов контуры смежных цитоплазматических мембран были размыты. Единичные свободные плазматические клетки обнаружены во внеклеточном матриксе.

В периваскулярной области ткани КРР встречались лимфоциты, которые также устанавливали ассоциативные контакты с фибробластами и макрофагами. Кроме формирования контактов с клетками стромального микроокружения отмечены плотные контакты лимфоцитов с опухолевыми клетками (рис. 5, *a*), однако ультраструктурных признаков цитотоксических лимфоцитов не обнаружено. Среди клеток гематогенного происхождения присутствовали также эозинофильные гранулоциты и тучные клетки. Ультраструктурное исследование показало, что эозинофилы частично или полностью гранулированы (рис. 5, *b*). В межклеточном матриксе выявлены лишь единичные свободные гранулы. Во всех исследуемых группах прослеживались изменения гранул, проявляющиеся в просветлении обычно плотного кристаллического ядра вследствие высвобождения части его содержимого.

Цитоплазма тучных клеток была заполнена однородными плотными гранулами, что говорит о зрелом фенотипе (рис. 5, *c*). Во всех группах исследования встречались мастоциты с признаками выхода свободных гранул через клеточную мембрану. Вблизи опухолевых клеток тучные клетки проявляли тотальную дегрануляцию с выходом содержимого гранул в межклеточный матрикс и формированием пустот в цитоплазме.

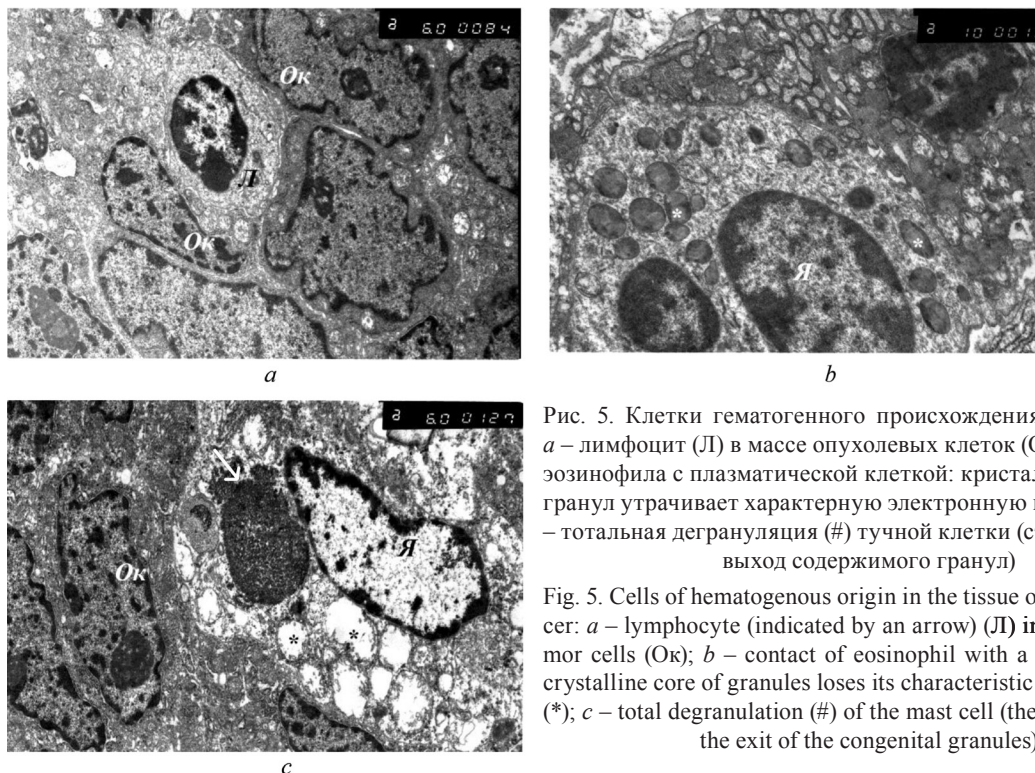


Рис. 5. Клетки гематогенного происхождения в ткани КРР: *a* – лимфоцит (Л) в массе опухолевых клеток (Ок); *b* – контакт эозинофила с плазматической клеткой: кристаллическое ядро гранул утрачивает характерную электронную плотность (*); *c* – тотальная дегрануляция (#) тучной клетки (стрелкой указан выход содержимого гранул)

Fig. 5. Cells of hematogenous origin in the tissue of colorectal cancer: *a* – lymphocyte (indicated by an arrow) (Л) in the mass of tumor cells (Ок); *b* – contact of eosinophil with a plasma cell: the crystalline core of granules loses its characteristic electron density (*); *c* – total degranulation (#) of the mast cell (the arrow indicates the exit of the congenital granules)

Выводы

1. У пацыентаў з рознымі формамі распаўсюджвання КРР выяўляюцца выключальна актывіраваныя фібробласты і міафібробласты.

2. Присутствие в строме КРР двух популяций макрофагов с различными ультраструктурными признаками свидетельствует об их функциональных различиях.

3. Выраженная инфильтрация стромы плазматическими клетками – характерный признак рака толстой кишки независимо от стадии опухолевого процесса, а также от наличия атипичных плазматических клеток с растянутыми элементами гранулярной эндоплазматической сети.

4. Прогрессирование КРР сопровождается дисфункцией клеточного и гуморального звеньев иммунитета: отсутствуют ультраструктурные признаки фагоцитоза в макрофагах, цитотоксическая активность лимфоцитов и присутствуют атипичные плазматические клетки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up / R. Labianca [et al.] // *Annals of Oncology*. – 2013. – Vol. 24, iss. 6. – P. vi64–vi72. DOI: 10.1093/annonc/mdt354
2. Злокачественные новообразования в Беларуси: преждевременная смертность населения трудоспособного возраста, социальные потери / Н. Н. Антоненкова [и др.] // Актуальные вопросы диагностики и лечения злокачественных новообразований : материалы Респ. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию кафедры онкологии / Белорус. гос. мед. ун-т ; под общ. ред. А. В. Прохорова. – Минск, 2014. – С. 13–14.
3. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь (2002–2011) / сост.: А. Е. Океанов, П. И. Моисеев, Л. Ф. Левин ; под ред. О. Г. Суконого. – Минск : Респ. науч.-практ. центр онкологии и мед. радиологии, 2012. – 333 с.
4. Adjei, I. M. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach / I. M. Adjei, S. Blanka // *J. of Functional Biomaterials*. – 2015. – Vol. 6, N 1. – P. 81–103. DOI: 10.3389/fonc.2015.00044
5. Dudas, J. Supportive and rejective functions of tumor stroma on tumor cell growth, survival, and invasivity: the cancer evolution / J. Dudas // *Frontiers in Oncology*. – 2015. – Vol. 5, N 44. – P. 1–2. DOI: 10.3389/fonc.2015.00044
6. Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth / K. Shiga [et al.] // *Cancers*. – 2015. – Vol. 7, N 4. – P. 2443–2458. DOI:10.3390/cancers7040902
7. Hanchen, Li. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer / L. Hanchen, F. Xueli, J. M. Houghton // *J. of Cellular Biochemistry*. – 2007. – Vol. 101, N 4. – P. 805–815. DOI: 10.1002/jcb.21159
8. Myofibroblasts in interstitial-lung diseases show diverse electron microscopic and invasive features / H. M. Karvonen [et al.] // *Laboratory Investigation*. – 2012. – Vol. 92, N 9. – P. 1270–1284. DOI: 10.1038/labinvest.2012.95
9. Eyden, B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine / B. P. Eyden // *J. of Cellular and Molecular Medicine*. – 2008. – Vol. 12, N 1. – P. 22–37. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2007.00213.x

References

1. Labianca R., Nordlinger B., Beretta G. D., Mosconi S., Mandalà M., Cervantes A., Arnold D. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 2013, vol. 24, iss. 6, pp. vi64–vi72. DOI: 10.1093/annonc/mdt354
2. Antonenkova N. N., Moiseev P. I., Mashevskii A. A., Yakimovich G. V. Malignant neoplasms in Belarus: premature mortality working-age population, the social loss. *Aktual'nye voprosy diagnostiki i lecheniya zlokachestvennykh novoobrazovaniy: materialy Respublikanskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 40-letiyu kafedry onkologii* [Actual problems of diagnosis and treatment of malignant neoplasms: proceedings of the Republican scientific-practical conference devoted to the 40th anniversary of the Department of Oncology]. Minsk, 2014, pp. 13–14 (in Russian).
3. Sukonko O. G. (ed.) *Statistics of cancer diseases in the Republic of Belarus (2002–2011)*. Minsk, Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology, 2012 (in Russian).
4. Adjei I. M., Blanka S. Modulation of the tumor microenvironment for cancer treatment: a biomaterials approach. *Journal of Functional Biomaterials*, 2015, vol. 6, no. 1, pp. 81–103. DOI: 10.3390/jfb6010081
5. Dudas J. Supportive and rejective functions of tumor stroma on tumor cell growth, survival, and invasivity: the cancer evolution. *Frontiers in Oncology*, 2015, vol. 5, no. 44, pp. 1–2. DOI:10.3389/fonc.2015.00044
6. Shiga K., Hara M., Nagasaki T., Sato T., Takahashi H., Takeyama H. Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 2443–2458. DOI: 10.3390/cancers7040902
7. Hanchen L., Xueli F., Houghton J. M. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, vol. 101, no. 4, pp. 805–815. DOI:10.1002/jcb.21159
8. Karvonen H. M., Lehtonen S., Sormunen R. T., Harju T. H., Lappi-Blanco E., Bloigu R. S., Kaarteenaho R. Myofibroblasts in interstitial-lung diseases show diverse electron microscopic and invasive features. *Laboratory Investigation*, 2012, vol. 92, no. 9, pp. 1270–1284. DOI:10.1038/labinvest.2012.95
9. Eyden B. The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2008, vol. 12, no. 1, pp. 22–37. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2007.00213.x

Информация об авторах

Деревянко Марина Александровна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mari.derewianko@mail.ru.

Рябцева Светлана Николаевна – канд. мед. наук, ассистент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sveta.rjabceva@tut.by.

Фридман Михаил Валерьевич – д-р мед. наук, заведующий лабораторией. Минский городской клинический онкологический диспансер (пр. Независимости, 64, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: mfridman@tut.by.

Деревянко Ирина Александровна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: irina.derewianko@yandex.by.

Залуцкий Иосиф Викторович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, директор. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: IZalutsky@gmail.com.

Information about the authors

Marina A. Derevyanko – Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mari.derewianko@mail.ru.

Svetlana N. Rjabceva – Ph. D. (Med.), Assistant. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sveta.rjabceva@tut.by.

Mikhail V. Fridman – D. Sc. (Med.), Head of the Laboratory. Minsk City Clinical Oncology Center (64, Nezavisimosti Ave., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mfridman@tut.by.

Irina A. Derevyanko – Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irina.derewianko@yandex.by.

Iosif V. Zalutskii – Corresponding Member, D. Sc. (Med.), Professor, Director. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: IZalutsky@gmail.com.