

УДК 615.849:616.13/14-008.6-092.9

НАТАЛІЯ АНДРІЇВНА МІТРЯЄВА, ЛІДІЯ ВОЛОДИМИРІВНА ГРЕБІНИК,
ОЛЬГА ПЕТРІВНА ЛУКАШОВА

ДУ «Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор'єва НАМН України», Харків

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ НА ВМІСТ VEGF У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ-ПУХЛИНОНОСІЇВ

Мета роботи. Вивчення рівня VEGF у сироватці крові щурів з перещепленою пухлиною Герена при дії ікс-випромінювання.

Матеріали і методи. 18 щурам-самицям популяції Вістар масою 160–180 г з перещепленою карциномою Герена проводили фракціоноване опромінення (5 Гр + 5 Гр) та (0,5 Гр + 0,5 Гр) зони росту пухлини на апараті РУМ-17 з інтервалом між сеансами 24 год. Забір крові проводили методом прижиттєвої декапітації через 24 год. після останньої фракції опромінення. Вміст VEGF у сироватці крові визначали методом імуноферментного аналізу з використанням стандартних наборів «Вектор-Бест» (Росія). Дослідження ультраструктури пухлини Герена виконували за стандартними методами електронної мікроскопії. На напівтонких зрізах під світловим мікроскопом підраховували мітотичний індекс та індекс клітин з гранулами, на ультратонких зрізах в електронному мікроскопі — індекс апоптозу.

Результати. Визначено, що при низьких дозах опромінення (0,5 Гр + 0,5 Гр) рівень VEGF був у 5,6 разу вище, ніж при опроміненні у високих дозах (5 Гр + 5 Гр). Порівняння коефіцієнтів відношення С контроль/С опромінення при різних дозах показало, що при низьких дозах опромінення коефіцієнт менше у 5,64 разу, ніж при високих дозах, тобто спостерігали значну різницю вмісту VEGF у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв залежно від доз опромінення. Отримані результати свідчать про безпосередню участь VEGF у відповіді на опромінення. При дії іонізуючої радіації у низьких дозах (1 Гр) спостерігається стимуляція процесів ангиогенезу, а при високих дозах (10 Гр) — процеси ангиогенезу уповільнюються. Виявлено зв'язок рівня VEGF зі структурно-функціональним станом карциноми Герена. При низькому рівні маркера у сумарній дозі 10 Гр спостерігаються порушення у судинах пухлини і посилення процесів апоптичної загибелі пухлинних клітин. При опроміненні в низьких дозах (сумарно — 1 Гр) на фоні підвищеного рівня VEGF не визначено посилення апоптозу в пухлині.

Висновки. З'ясовано особливості впливу ікс-випромінювання на рівень VEGF у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв залежно від дози опромінення. Визначено інгібування апоптозу в пухлині Герена при фракціонованому опроміненні 0,5 Гр + 0,5 Гр на фоні гіперекспресії VEGF та посилення процесів апоптичної загибелі пухлинних клітин при фракціонованому опроміненні в дозі 5 Гр + 5 Гр і низькому рівні VEGF.

Ключові слова: ікс-випромінювання, фактор росту ендотелію судин (VEGF), ангиогенез, апоптоз.

Нині встановлено тісний зв'язок між пухлиною та процесами ангиогенезу [1]. Ендотеліальний фактор росту судин (VEGF — vascular endothelial growth factor) є найбільш важливим фактором ангиогенезу, який впливає на диференціювання клітин ендотелію, їх міграцію, проліферацію і утворення судин [2, 3]. Окрім стимуляції росту пухлини та індукції ангиогенезу VEGF має низку додаткових властивостей. До них належить підсилення резистентності пухлини до променевої терапії. Показано, що гіперекспресія VEGF знижує відповідь пухлини на променево та хіміотерапію [4]. Разом із тим недостатньо вивчена роль ангиогенезу в пухлині при дії іонізуючої радіації, у тому числі при різних видах і режимах опромінення. Прицільне пригнічення активності VEGF

може мати суттєве значення для променевої терапії пухлин.

Метою роботи є вивчення рівня VEGF у сироватці крові щурів з перещепленою пухлиною Герена при дії ікс-випромінювання.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведено на 18 щурах-самицях популяції Вістар масою 160–180 г, яким було проведено перещеплення карциноми Герена. Тварини утримувались у стандартних умовах віварію. Всі дослідження на щурах виконували з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985), і Національних загальних етичних принципів експериментів на тваринах

(Україна, 2001). Щурам підшкірно вводили 0,5 мл 20% суспензії клітин, отриманих з пухлинної тканини експериментальної карциноми Герена (Guegin's carcinoma), штамп якої було одержано з Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України. Експеримент починали на 10–12-ту добу після перещеплення пухлини, коли розміри пухлинного вузла досягали у діаметрі 1,5–2,0 см. Локальне опромінення зони росту пухлини проводили на апараті РУМ-17 (ікс-випромінення) за стандартних технічних умов: напруга — 190 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри: 0,5 мм Cu плюс 1 мм Al, потужність поглинутої дози у повітрі ікс-випромінення — 1,36 Гр/хв, фокусна відстань 30 см. Опромінення проводили фракційно при поглинутій дозі на фракцію 5 Гр, час опромінення — 3 хв 44 с, та при поглинутій дозі на фракцію 0,5 Гр, час опромінення — 22 с, із інтервалом між сеансами 24 год, сумарна поглинута доза на зону росту пухлини складала 10 Гр (5 Гр + 5 Гр) та 1 Гр (0,5 Гр + 0,5 Гр). Забір крові проводили методом прижиттєвої декапітації через 24 год. після останньої фракції опромінення. Концентрацію VEGF визначали методом ІФА на напівавтоматичному імуноферментному аналізаторі «Immunochem-2100» (США) з використанням стандартних наборів реактивів ЗАО «Вектор-Бест», Росія. Сироватку отримували шляхом центрифугування крові при 3000 об/хв протягом 15 хв.

Дослідження ультраструктури пухлини Герена проводили за стандартними методами електронної мікроскопії [5]. Шматочки пухлини витримували спочатку у глутаральдегідному фіксаторі за Карновським, потім у тетраоксиді осмію за Палладе. Після дегідратації в етанолі зростаючої концентрації та ацетоні матеріал заливали у суміш епоксидних смол епон-араддит та полімеризували протягом 36 год. при температурі 56 °С. З одержаних блоків виготовляли напівтонкі зрізи на ультрамікромомі УМТП-4 Сумського ВО «Електрон» та забарвлювали метиленовим синім на 1% тетрабораті натрію. Ультратонкі зрізи виготовляли на тому ж мікромомі, контрастували у 2% розчині уранілацетату та цитраті свинцю за Рейнольдсом та аналізували в електронному мікроскопі ЭМ-125 того ж виробника. На напівтонких зрізах під світловим мікроскопом підраховували мітотичний індекс (кількість мітозів на 100 пухлинних клітин) та індекс клітин із гранулами (кількість клітин з гранулами на 100 пухлинних клітин), на ультратонких зрізах в електронному мікроскопі — індекс апоптозу (кількість апоптозів на 100 пухлинних клітин).

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою пакета статистичних програм для ПК «Statistica» при використанні параметричних (Стьюдента-Фішера) та непараметричних методів для малих вибірок, порівнювали їх між групами за допомогою критерію Вілкоксона при порівнянні парних вибірок, розбіжності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За видом впливу тварини були поділені на три групи: 1 — інтактні пухлиноносії (контроль), 2 — фракціоноване опромінення у сумарній дозі 1 Гр (0,5 Гр + 0,5 Гр), 3 — фракціоноване опромінення у сумарній дозі 10 Гр (5 Гр + 5 Гр). Оцінку впливу опромінення на вміст VEGF проводили в порівнянні з інтактними тваринами-пухлиноносіями. Порівнювали вміст досліджуваного маркера у крові контрольних тварин з концентрацією маркера у крові щурів після опромінення за коефіцієнтом співвідношення $K = C \text{ контроль} / C \text{ опромінення}$, де $C \text{ контроль}$ — концентрація маркера у крові контрольних тварин, $C \text{ опромінення}$ — концентрація маркера у крові тварин-пухлиноносіїв після дії іонізуючої радіації.

У таблиці 1 представлені дані вмісту VEGF у крові щурів-пухлиноносіїв після фракціонованого опромінення при різних дозах.

Як видно з таблиці 1, рівень VEGF у контрольній групі склав $329,5 \pm 131,6$ пг/мл. Після фракціонованого опромінення у дозах 0,5 Гр + 0,5 Гр рівень VEGF підвищувався у 1,5 разу, а у тварин, які були опромінені у дозах 5 Гр + 5 Гр, рівень VEGF вірогідно знижувався у 3,7 разу порівняно з контрольною групою.

Таблиця 1

Вплив ікс-випромінення на вміст VEGF у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв ($X \pm Sx$)

Група піддослідних тварин	n	VEGF, пг/мл	K
Контроль	6	$329,5 \pm 131,6$	—
Опромінення 0,5 Гр + 0,5 Гр	6	$503,0 \pm 128,3$	0,65
Опромінення 5 Гр + 5 Гр	6	$89,6^{*#} \pm 34,7$	3,67

Примітки:

* — значущість відмінностей відносно групи контролю ($p < 0,05$);

— значущість відмінностей між групами ($p < 0,05$) (критерій Вілкоксона).

Рівень VEGF при фракціонованому опроміненні низькими дозами (0,5 Гр + 0,5 Гр) був у 5,6 разу вище, ніж при опроміненні у високих дозах (5 Гр + 5 Гр). Порівняння коефіцієнтів відношення $C \text{ контроль} / C \text{ опромінення}$ при різних дозах показало, що при низьких дозах опромінення коефіцієнт менше у 5,64 разу, ніж при високих дозах, тобто спостерігали значну різницю вмісту VEGF у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв залежно від доз опромінення.

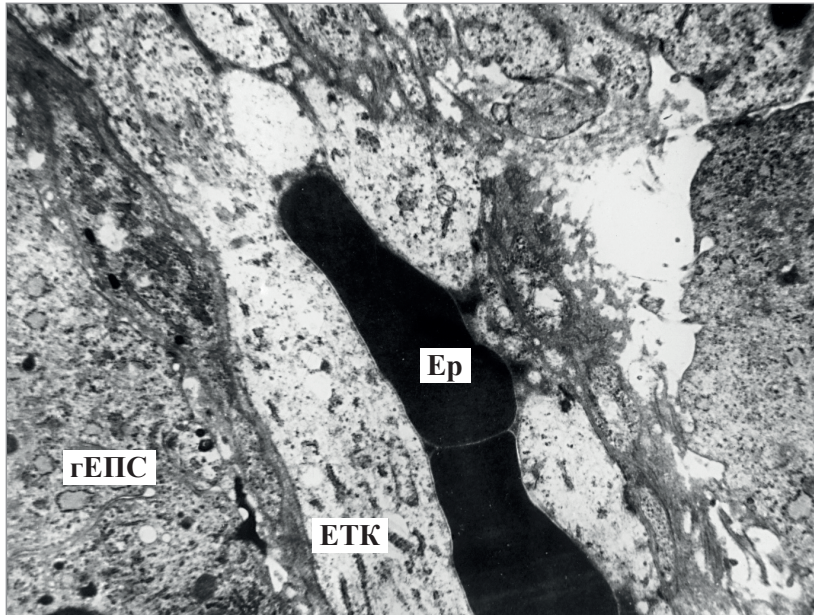
Оскільки VEGF є відомим маркером активності неоангіогенезу, підвищення даного показника у крові щурів-пухлиноносіїв після опромінення у сумарній дозі 1 Гр свідчить про стимуляцію процесів неоангіогенезу. Опромінення у сумарній дозі 10 Гр викликає значне уповільнення цього процесу.

Отримані результати свідчать про безпосередню участь VEGF у відповіді на опромінення. Слід зазначити, що низькі дози іонізуючої радіації (1 Гр) та високі дози (10 Гр) по-різному впливають на експресію VEGF і тим самим на процеси ангіогенезу. Такі дані узгоджуються з дослідженнями, які продемонстрували, що низькі дози (0,8 Гр) прискорюють ангіогенез і розвиток

ендотеліальної сітки у пухлині мишей, спричиняють її ріст та утворення метастазів, залежних від VEGF [6].

Крім стимуляції зростання пухлини шляхом індукції ангиогенезу, VEGF має низку додаткових властивостей, які відіграють важливу роль у виживанні і зростанні пухлини. До них належить антиапоптична дія на пухлинні клітини, яка призводить до підсилення радіорезистентності пухлини, підвищення ризику метастазування [6].

У зв'язку з цим, для визначення процесів апоптозу в пухлині Герена після дії іонізуючої радіації, були проведені електронно-мікроскопічні дослідження. Показано, що при дії радіації у сумарній дозі 1 Гр (0,5 Гр + 0,5 Гр) у судинах пухлини Герена спостерігається набряк цитоплазми ендотеліальних клітин, а опромінення у дозі 10 Гр (5 Гр + 5 Гр) викликає значні порушення тонкої будови судин і навіть їх некроз (рис. 1, 2).

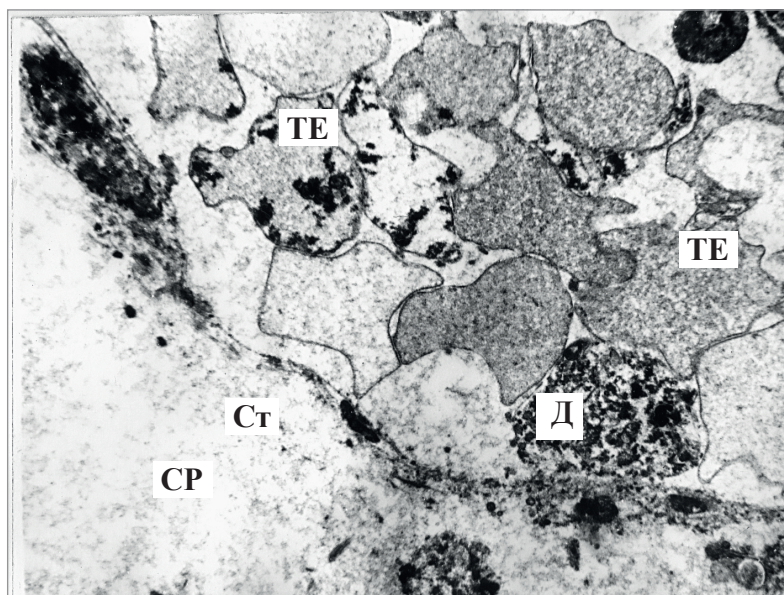


Набряк цитоплазми ендотеліальної клітини, еритроцитарний склад у просвітку судини. ЕТК — ендотеліальна клітина.

Рис. 1. Карцинома Герена після ікс-опромінення у сумарній дозі 1 Гр

Доведено, що при дозі опромінення 1 Гр (0,5 Гр + 0,5 Гр) апоптичний індекс пухлинних клітин ($0,52 \pm 0,17$) не перевищує контрольних значень ($0,38 \pm 0,15$), тоді як дія опромінення у дозі 10 Гр

(5 Гр + 5 Гр) призводить до вірогідного зростання апоптичного індексу ($0,95 \pm 0,23$) як у порівнянні з контрольною групою, так і групою з опроміненням у дозі 1 Гр ($p < 0,05$).

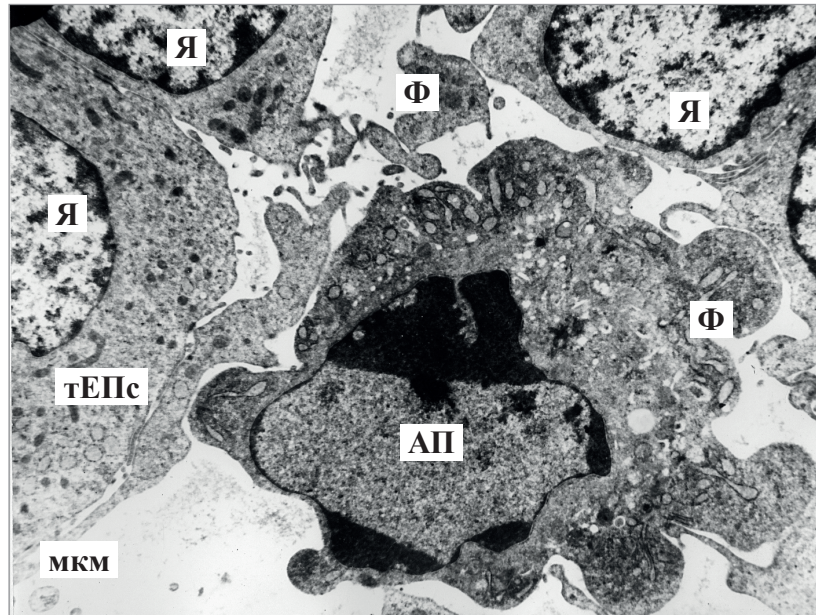


Некротична судина з тінями еритроцитів та клітинним детритом, Ст — стінка судини, ТЕ — тінь еритроцита, Д — клітинний детрит.

Рис. 2. Карцинома Герена після ікс-опромінення у сумарній дозі 10 Гр

Отже, спостерігаються певні закономірності зв'язку рівня VEGF зі структурно-функціональним станом карциноми Герена. При низькому рівні маркера при дозі 10 Гр спостерігаються порушення у судинах пухлини і посилення процесів апоптичної

загибелі пухлинних клітин (ПК) (рис. 3). При опроміненні в низьких дозах (1 Гр) на фоні підвищеного рівня VEGF не визначено посилення апоптозу в пухлині, тобто спостерігається резистентність до дії іонізуючої радіації.



АП — ядро у стані апоптозу, Ф — фестоноподібні відростки цитоплазми.

Рис. 3. Пухлинна клітина у стані апоптозу

Таким чином, проведені експериментальні дослідження свідчать, що іонізуюча радіація впливає на вміст VEGF у сироватці крові тварин-пухлиноносіїв. Слід зазначити, що особливості дії обумовлені різними дозами опромінення. Опромінення при низьких дозах може сприяти підвищенню експресії VEGF, що знижує відповідь пухлини на опромінення. Це передбачає використання при ПТ антиангіогенних препаратів. Протипухлинний ефект досягається підвищенням високої дози іонізуючого випромінювання, який спроможний забезпечити летальне ушкодження великої кількості пухлинних клітин. Ці спостереження по-новому висвітлюють механізми прометастатичних ефектів іонізуючої радіації та відкривають нові терапевтичні перспективи досліджень для поліпшення терапевтичних протоколів.

ВИСНОВКИ

З'ясовано особливості впливу ікс-випромінювання на рівень VEGF у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв залежно від дози опромінення. Спостерігалось підвищення даного показника після опромінення у сумарній дозі 1 Гр, це свідчить про стимуляцію процесів неоангіогенезу і зниження VEGF при сумарній дозі 10 Гр, що відображає інгібування неоангіогенезу.

За даними електронно-мікроскопічних досліджень встановлено, що при опроміненні у дозі 1 Гр у пухлині Герена відбувається інгібування апоптозу за умов гіперекспресії VEGF, що свідчить про її радіорезистентність. При опроміненні в дозі 10 Гр і низькому рівні VEGF визначені порушення у судинах пухлини і посилення процесів апоптичної загибелі пухлинних клітин, що, безперечно, обумовлює радіаційний ефект ікс-випромінювання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кадагидзе З. Г. Основные опухолевые маркеры / З. Г. Кадагидзе, В. М. Шелепова // Пробл. клин. медицины. — 2008. — № 2. — С. 10–17.
2. Hanahan D. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis / D. Hanahan, J. Folkman // Cell. — 2006. — Vol. 86. — P. 353–364.
3. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза / В. П. Чехонин, С. А. Шеин, А. А. Корчагина, О. И. Гурина // Актуальные вопросы онкологии — 2012. — № 2. — С. 18–24.
4. Гладиліна І. А. Радиосенсибілізація в лучевій терапії злоякісних новоутворень / І. А. Гладиліна // Онкологія, гематологія і радіологія. — 2011. — № 1. — С. 46–54.
5. Electron Microscopy in Biology / A. Practical, Ed. Approach, J. R. Harris. — Oxford University Press, 1991. — P. 308.
6. Low Doses of Ionizing Radiation Promote Tumor Growth and Metastasis by Enhancing Angiogenesis [Електронний ресурс] / I. S. Vala, L. R. Martins, N. Imaizumi et al. — 2010. — Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011222.g001>

Стаття надійшла до редакції 30.01.2018.

Н. А. МИТРИЯЕВА, Л. В. ГРЕБЕННИК, О. П. ЛУКАШОВА

ГУ «Институт медицинской радиологии им. С. П. Григорьева НАМН Украины», Харьков

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ VEGF В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ

Цель работы. Изучение уровня VEGF в сыворотке крови крыс с перевитой опухолью Герена при действии рентгеновского облучения.

Материалы и методы. 18 крысам-опухоленосителям популяции Вистар массой 160–180 г с перевитой карциномой Герена проводили фракционированное облучение (5 Гр + 5 Гр) и (0,5 Гр + 0,5 Гр) зоны роста опухоли на аппарате РУМ-17, с интервалом между сеансами 24 часа. Забор крови проводили методом прижизненной декапитации через 24 часа после последней фракции облучения. Содержание VEGF в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных наборов «Вектор-Бест» (Россия). Исследования ультраструктуры опухоли Герена проводили по стандартным методам электронной микроскопии. На полутонких срезах под световым микроскопом подсчитывали митотический индекс и индекс клеток с гранулами, на ультратонких срезах в электронном микроскопе — индекс апоптоза.

Результаты. Установлено, что при низких дозах облучения (0,5 Гр + 0,5 Гр) уровень VEGF был в 5,6 раза выше, чем при облучении высокими дозами (5 Гр + 5 Гр). Сравнение коэффициентов соотношения С контроль / С облучение при разных дозах показало, что при низких дозах облучения коэффициент меньше в 5,64 раза, чем при использовании высоких доз, то есть наблюдается значительная разница содержания VEGF в сыворотке крови крыс в зависимости от доз облучения. Полученные результаты свидетельствуют о непосредственном участии VEGF в ответе на облучение. При действии ионизирующей радиации в низких дозах (1 Гр) наблюдается стимуляция процессов ангиогенеза, а при высоких дозах (10 Гр) — процессы ангиогенеза замедляются. Выявлена связь уровня VEGF со структурно-функциональным состоянием карциномы Герена. При низком уровне маркера и суммарной дозе 10 Гр наблюдаются нарушения в сосудах опухоли и усиления процессов апоптической гибели опухолевых клеток. При облучении в низких дозах (суммарно — 1 Гр) на фоне повышенного уровня VEGF не наблюдается увеличения апоптоза в опухоли.

Выводы. Выявлены особенности влияния рентгеновского облучения на уровень VEGF в сыворотке крови крыс-опухоленосителей в зависимости от дозы облучения. Установлено ингибирование апоптоза в опухоли Герена при фракционированном облучении 0,5 Гр + 0,5 Гр на фоне гиперэкспрессии VEGF и усиление процессов апоптической гибели опухолевых клеток при фракционированном облучении в дозе 5 Гр + 5 Гр и низком уровне VEGF.

Ключевые слова: рентгеновское облучение, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиогенез, апоптоз.

N. A. MITRYAEVA, L. V. GREBENIK, O. P. LUKASHOVA

SI «Grigoriev Institute for Medical Radiology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv

INFLUENCE OF IONIZING RADIATION ON VEGF CONTENT IN THE BLOOD SERUM OF TUMOR-BEARING RATS

Purpose. To study VEGF level in the blood serum of rats with a transplanted Heren tumor under X-ray irradiation.

Materials and methods. Twenty tumor-bearing rats of Wistar population weighing 160–180 g, with transplanted Heren carcinoma, were exposed to fractionated irradiation (5 Gy + 5 Gy) along with (0.5 Gy + 0.5 Gy) the tumor growth zone by means of RUM-17 device, with 24 hours intersession interval. Blood sampling was performed via life-time decapitation method 24 hours after the last irradiation fraction. VEGF content in the blood serum was assessed by means of enzyme immunoassay method applying standard Vector-Best kits (Russia). Heren tumor metastructure study was carried out in accordance with electron microscopy standard methods. The mitotic index and the index of cells with granules were counted in semifine sections under light microscope, the apoptosis index — in ultrathin sections under electron microscope.

Outcomes. It was found that at low irradiation doses (0.5 Gy + 0.5 Gy), VEGF level was 5.6 times higher than when irradiated with high doses (5 Gy + 5 Gy). Comparison of C control / C ratio at different doses showed that at low doses the coefficient is 5.64 times less than when using high doses, i.e., there is a significant difference in VEGF content in the blood serum of rats depending on radiation doses. The obtained outcomes indicate a direct participation of VEGF in the response to irradiation. During the action of ionizing radiation at low doses (1 Gy), angiogenesis processes are stimulated, and at high doses (10 Gy) angiogenesis processes are slowed down. The relationship between VEGF level and the structural and functional state of the Guerin carcinoma was revealed. In a low level of the marker and total dose of 10 Gy, disturbance in tumor vessels and enhancement of apoptotic death of tumor cells are observed. When irradiated at low doses (total — 1 Gy), increased apoptosis in the tumor associated with increased VEGF level is not observed.

Conclusions. The peculiarities of x-ray irradiation impact on VEGF level in the blood serum of tumor-bearing rats depending on the dose of irradiation have been ascertained. Inhibition of apoptosis in Heren tumor with

fractionated irradiation of 0.5 Gy + 0.5 Gy was established in the setting of hyperexpression of VEGF and intensification of apoptotic death of tumor cells with fractionated irradiation at a dose of 5 Gy +5 Gy and VEGF low level.

Keywords: X-ray irradiation, vascular endothelial growth factor (VEGF), angiogenesis, apoptosis.

Контактна інформація:

Мітряєва Наталія Андріївна

д-р біол. наук, старш. наук. співроб., зав. лабораторії радіац. онкології ДУ «ІМР НАМН України»

тел.: +38 (057) 725-50-28

e-mail: radoncol_lab@ukr.net