

В.А. Зінченко,
Л.І. Чащина

Інститут молекулярної
біології і генетики
НАН України,
Київ

Набута радіорезистентність пухлинних клітин

Acquired resistance of tumor cells

Цель работы: Изучение механизмов формирования в опухолевых клетках устойчивости к действию ионизирующей радиации.

Материалы и методы: Для моделирования процесса радиорезистентности (РР) получены РР-штаммы — варианты карциномы Герена и лимфосаркомы Плисса крыс, культуры трансформированных фибробластов L₉₂₉.

Результаты: После повторных облучений в дозе 12 Гр на РР-варианте штамма L₉₂₉ изучены свойственные ему цитологические характеристики, которые позволяют судить о специфичности состояния РР. В ходе этого процесса закономерно увеличивается полиморфизм клеток, их ядер, мембранных структур. Полученные искусственным путем, устойчивые к облучению варианты опухолей отличаются от их классических предшественников особенностями роста, морфологией и метаболизмом. На этапах формирования РР существенно возрастает внутрипопуляционная гетерогенность опухолевых клеток и изменчивость генераций РР опухолей. В результате анализа цитологических и биохимических особенностей РР, приобретенных клетками в культуре *in vitro*, *in vivo* и на трансплантированных опухолях, выделены 17 основных характерных признаков РР. Из них 5 (на основании разработанного алгоритма), как наиболее типичные и стабильные, рекомендуется использовать в качестве объективных лабораторных критериев РР опухолевых клеток.

Выводы: Полученные РР-штаммы отличались от диких особенностями роста, морфологией и метаболизмом. Возникновение РР является следствием двух взаимосвязанных процессов — селективного отбора наиболее РР части клеточной популяции и формирования новых признаков в ходе адаптивно-приспособительных реакций, обусловленных клеточным стрессом, вызванным действием ионизирующей радиации.

Ключевые слова: ионизирующая радиация, опухолевые клетки, радиорезистентность, культура клеток *in vitro* и *in vivo*, морфологические изменения.

Objective: To study the mechanisms of forming tumor cell resistance to ionizing radiation.

Material and Methods: To simulate the process of radioresistance (RR), RR strains, variants of Guerin's carcibnoma and Pliss lymphosarcoma, cultures of transformed fibroblasts L₉₂₉ were obtained.

Results: The characteristic cytological characteristics, which allow to assess RR state specificity, were investigated after repeated exposure of the RR strain to a dose of 12 Gy. This increased polymorphism of the cells, their nuclei, membrane structures.

The obtained artificial RR variants of the tumors differed from their classical ancestors in the character of the growth, morphology and metabolism. Intrapopulation heterogeneity of the cells and changes in RR tumors generations increased with the stage of RR formation. The analysis of cytological and biochemical characteristics of RR obtained by the cells *in vitro*, *in vivo* and on transplanted tumors, allowed to distinguish 17 main characteristic signs of RR. Five of them most typical and stable (based on the developed algorithm) are recommended to use as objective laboratory criteria of tumor cells RR.

Conclusion: The obtained RR strains differed from the wild ones in the character of their growth, morphology and metabolism. RR development results from two interrelated processes, i.e. selection of the most RR portion of the cellular population and formation of new features during adaptive reactions due to cellular stress caused by ionizing radiation.

Key words: ionizing radiation, tumor cells, radioresistance, *in vitro* and *in vivo* cell culture, morphological changes.

Радіорезистентність (РР) клітин пухлин — найважливіша причина недостатньої ефективності променевої терапії (ПТ) бластом і протипухлинної терапії в цілому, у якій промєнєвий компонент відіграє найважливішу роль. Радіорезистентність — окремиї випадок виявлення загальної неспецифічної резистентності як стадії стресу, відповідної реакції клітин на екстремальні впливи. Резистентність пухлинних клітин формується у відповідь на вплив фізичних і хемічних факторів. У цих умовах частина клітинної популяції новоутвору виходить із проліферативного пулу. У стані спокою клітини пухлини здобувають максимальну стійкість до ПТ і стають резервом репопуляції новоутвору після радикальної терапії [1]. І самі радикальні впливи, поряд із загибеллю основної клітинної маси пухлини, діють на резистентність як могутній фактор відбору. З іншого боку, промєнєва і хемотерапія виступають як

модифікуючий мутагенний агент, сприяючи виробленню ще більшої стійкості пухлинних клітин, що виживають.

Феномен набутої хеморезистентності пухлинних клітин інтенсивно вивчається, розкрито механізми її формування [2–4]. Природу і механізми набутої РР пухлинних клітин вивчено незрівнянно менше. У світовій літературі немає цілісного уявлення про її сутність, а нечисленні експериментальні роботи стосуються несуттєвих подробиць. Не розроблено цитологічні критерії РР пухлин, що не дозволяє вчасно діагностувати цей стан і відповідно коригувати схеми комплексної терапії.

Метою даного дослідження було комплексне вивчення закономірностей і механізмів формування набутої (вторинної) РР пухлинних клітин у експерименті, виявлення цитологічних маркерів РР і побудова на їх основі алгоритму діагностики РР-пухлин.

Методика дослідження

Були використані такі експериментальні моделі: трансплантована карцинома Герена, саркома-45 і лімфосаркома Плісса щурів. Цитодинамічні зміни вивчали в модельних системах *in vitro* на лініях клітин: Нер-2 та асинхронна культура трансформованих метилхолантеном фібробластів мишей L_{929} . Після тривалої експериментальної роботи отримано РР-штами — варіанти карциноми Герена і лімфосаркоми Плісса щурів і РР варіант клітин культури L_{929} . На етапах вироблення вторинної РР цих штамів досліджували динаміку цитологічних, гістологічних ознак РР, їх порівняльну інформативність і можливості використання як маркерів РР. У дослідженнях застосовано такі методики.

Променеву терапію пухлин, а також опромінювання з метою вироблення РР, здійснювали на апараті РУМ-17 за таких (завжди стандартних) технічних умов: 180 кВ, 10 мА, фільтри 0,5 мм Cu + 1,0 мм Al, шкірно-фокусна відстань 25 см, потужність дози 1,25 Гр/хв.

Перещеплення пухлин здійснювали за загальноприйнятою методикою щурам масою 110 ± 10 г розведеної віварію ІО АМН України і мишам $C_{57}Bl$ масою 17–18 г. При досягненні новоутворами об'єму $3,4 \pm 0,9$ – $6,1 \pm 0,4$ см³ (залежно від мети експерименту) їх локально опромінювали в дозі 40–60 Гр одноразово або фракціоновано (по 10 Гр × n). При опромінюванні тіло тварин (крім пухлини) екранували свинцем завтовшки 3 мм.

При виробленні вторинної РР тварин з перещепленими пухлинами поділяли на 2 групи — контрольну й дослідну. Щурів контрольної групи не піддавали ніяким впливам, дослідної групи — локально опромінювали в сумарній дозі 40–50 Гр (по 10 Гр на фракцію). Рецидиви пухлин використовували для перещеплення, а потім повторювали процедуру опромінювання. Здійснено 20 таких етапів ретрансплантації і ПТ карциноми Герена і 9 етапів — лімфосаркоми Плісса.

Цитологічні дослідження виконували на трьох рівнях: *in vitro* — на клітинних культурах, *in vivo* — на експлантатах пухлин людини і тварин, культивованих у дифузійних камерах (ДК), і *in vivo* — на пухлинах тварин. Культуру клітин *in vitro* вирощували в пеніцилінових флаконах на покривних скельцях 5 × 5 мм із щільністю посадки 10^5 клітин/мл на середовищі складу: 40 % середовища 199, 40 % гідролізату лактальбуміну, 20 % сироватки бичачої крові і по 20 мг/мл пеніциліну і гентаміцину. Дифузійні камери з використанням нітроцелюлозних фільтрів Синпор з діаметром пор 0,23 мкм по дві експлантували в черевну порожнину щурів.

При статистичній обробці отриманого матеріалу, поряд з критерієм Стьюдента, використовували кінетичний аналіз за допомогою математичної моделі Гомпертца. Параметри моделі визначали методом нелінійної регресії на ПЕОМ ІВМ РС/АТ.

Результати та їх обговорення

Дослідження в системі *in vitro* дають можливість аналізувати клітинні механізми формування РР у найбільш чистому вигляді, без участі тканинних механізмів. На клітинах L_{929} у логарифмічній фазі росту, опроміненіх у діапазоні доз 5–20 Гр, визначили величину LD_{50} , що, як виявилось, дорівнює 11,8 Гр. При повторному радіаційному впливі на клітини, що вижили після першого опромінення в дозі 12 Гр, робили селективний відбір на РР [5].

У процесі вироблення останньої закономірно зростав поліморфізм клітин L_{929} (рис. 1), гетерогенність їх розмірів і форми, ядер, ядерцець та збільшувалася кількість останніх, як і багатоядерних клітин, частіше з непарною кількістю ядер, та частота анізокаріозу. Після повторного опромінювання характерним було різке збільшення кількості, довжини і товщини цитоплазматичних відростків (до 5–6 на клітину), посилення міжклітинних взаємодій, кооперативних процесів у клітинному моношарі. Це були явні ознаки пристосування до повторної дії випромінювання. Поряд з такими зміненими траплялися й клітини в стані некробіозу, некрозу та апоптозу, а також структурно незмінні. З кожною генерацією зростала вираженість дегенеративних змін. На 3-му етапі вироблення РР збільшувалася варіабельність мікрорельєфу клітинної поверхні: з'являлися мікрворсинки, інвагінації (трубочки і складки) пальцеподібних і кільцеподібних форм, зростала частота виникнення полікаріонів, симпластових структур. Результати досліджень *in vitro* показали, що процес вироблення РР у культурі клітин — це результуюча селективного відбору більш резистентних за своєю природою клітин, з одного боку, і формування адаптивних ознак, з іншого.

Дослідження в культурі *in vivo* у ДК підтвердили основні закономірності, виявлені на клітинах у культурі *in vitro*. При культивуванні в ДК пухлинного матеріалу, отриманого з карциноми Герена щурів на різних етапах вироблення РР, встановлено закономірне хвилеподібне (від генерації до генерації) збільшення гетерогенності і поліморфізму клітинної популяції. Зростала кількість дво- і багатоядерних клітин-полікаріонів, істотно відмінних від «променевих велетнів», що є продуктами анеуплоїдії, патологічних ендомітозів або злиття трансформованих клітин [6]. Істотно, що іноді при формуванні РР цитоплазма клітин набуває ознак диференціації.

Якщо клітини інтактною карциноми Герена, культивовані в ДК, відрізняються високою однорідністю розмірів (76 % їх ядер мають площу у вузькому діапазоні 60–120 мкм², утворюючи один модальний клас), то при формуванні РР варіабельність площ ядер зростає в 2–3 і більше разів. На 3-му етапі формування РР збільшується кількість дрібних клітин із площею ядер 30–90 мкм² — до 66 % популяції, реєструються вже 3 модальні класи. На наступних етапах зро-

стає і частота більших клітин, а кількість модальних класів досягає 6. На 5-му етапі частка клітин з малими ядрами (до 60 мкм²) складає 28 %, а великих клітин (180 мкм²) — 17 %. Усього ж великі ядра (120–240 мкм²) на 5-му етапі склали 47 %. Таким чином, РР може бути пов'язана як зі збільшенням, так і зменшенням розмірів ядер. У 6-й генерації великі клітини становили 58 %. Далі їх число знижувалося. На 12-й стадії розподіл розмірів ядер був максимально гетерогенним. Параметри проліферативної активності клітин карциноми Герена на 3, 5, 6, 7, 12-му етапах вироблення РР майже не змінювалися. Характерним було збільшення в 4–7 разів частоти патологічних мітозів (табл. 1) при типовому підвищенні утворення сфероїдів (рис. 2) у зв'язку з РР. Максимум сфероїдоутворення відзначено в 3, 5 і 12-й генераціях РР карциноми Герена [6].

Таблиця 1

Зміна параметрів проліферативної активності клітин карциноми Герена в динаміці формування РР (за даними культури тканини in vivo в ДК)
Changes of proliferative activity parameters in Guerin's carcinoma cells during RR formation (according to in vivo tissue culture)

Група тварин	Мітотичний індекс	Аберантний мітоз	Індекс мітки
	відсоток (у 100 полях зору)		
Контроль	4,8	0,2	14,4
Генерація			
3	3,6	1,0	14,4
5	3,6	0,8	14,4
6	3,8	1,0	13,8
7	3,4	1,0	13,4
12	3,4	1,4	13,4

Таким чином, результати, одержані при формуванні РР пухлинних клітин, за даними дослідів на культурі карциноми Герена в ДК, свідчать про хвилеподібне наростання збільшення гетерогенності клітинних популяцій, зростання поліморфізму клітин і ядер, сфероїдоутворення. Ця різноманітність форм і розмірів клітин відображує адаптивний характер процесу, розширення спектра клітинного відбору на РР. При цьому варто враховувати, що відбір на РР ще не забезпечує в усіх випадках переважного виживання РР клітин, оскільки останні можуть поступатися клітинам основного модального класу за іншими, не пов'язаними з дією радіації, критеріями життєдіяльності, їх геном може виявитися менш збалансованим.

Дослідження in vivo на трансплантованих пухлинах продемонстрували, що у відповідь на повторний вплив радіації в терапевтичних дозах, з кожною наступною генерацією відбувається зменшення маси клітин, що зберігають життєздатність, і розростання фіброзної сполучної тканини. У пухлинних клітинах дистрофічні зміни переважають над деструктивними, що веде до некрозу. Параметри мітотичного циклу клітин карциноми Герена у процесі вироблення РР не змінювалися. Але клітинний цикл продовжувався за рахунок збільшення кількості клітин у фазі спокою (G₀).

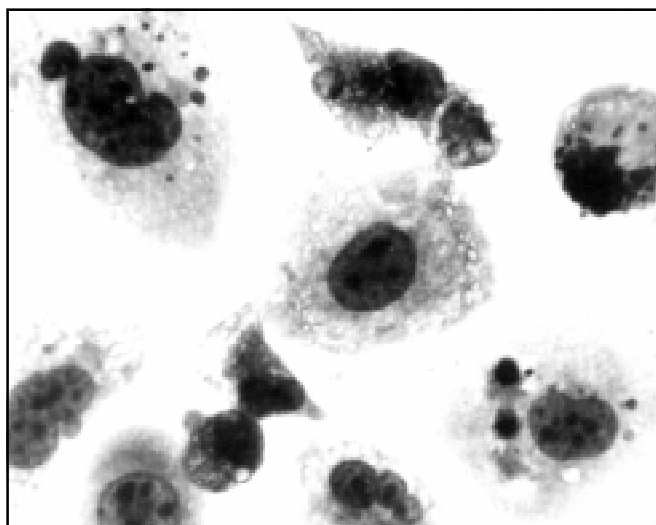


Рис. 1. Мікроснімок типового патоморфозу клітин L₉₂₉ у динаміці формування РР, зб. × 900; забарвлення гематоксилином Караччі

Fig. 1. Microphotograph of a typical pathomorphosis of L₉₂₉ cells during RR formation, × 900; Caracci stain with hematoxyllin

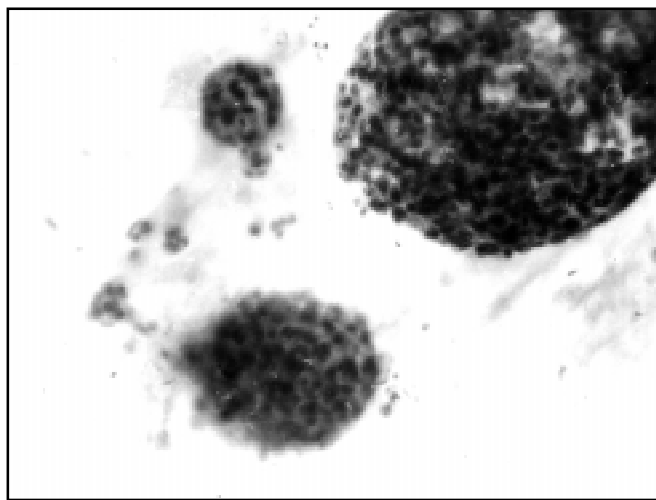


Рис. 2. Мікроснімок сфероїдоутворення в дифузійних камерах, типового для РР карциноми Герена, зб. × 100; забарвлення гематоксилином Караччі

Fig. 2. Microphotograph of spheroid formations in the diffuse cameras typical for RR Guerin's carcinoma, × 100; Caracci stain with hematoxyllin

Найважливіші зміни під впливом багаторазового повторення курсів ПТ розвиваються в клітинному ядрі і морфологічно виявляються у формі патологічних мітозів, тобто порушень процесу розподілу хроматину між дочірніми клітинами, формування незбалансованих каріотипів, анеуплоїдії і поліплоїдії. З трьох основних типів патологічних мітозів (ушкодження хромосом, мітотичного апарату і цитотомії) найбільш істотні при виробленні РР ушкодження хромосом, особливо хромосомні і хроматидні мости, дицентрики і фрагменти, утворення мікроядер.

Аналіз динаміки росту карциноми Герена у процесі вироблення РР виявив позитивний збіг експериментальних даних і розрахункових, отриманих на підставі клонально-селективної теорії резистентності з використанням формули Гомпертца — математичної моделі динаміки двох клітинних субпопуляцій, що мають різну чутливість до цитотоксичного агента і різну швидкість росту [7]. Показано, що вихідна гетерогенність клітинної популяції пухлини є основою для селективного відбору, зокрема на РР. У випадку карциноми Герена існують, як мінімум, дві субпопуляції клітини, з яких у нормі домінують (77 %) клітини S-типу, що швидко зростають і є чутливими до радіації. У процесі вироблення РР починають домінувати такі, що повільно зростають, і стійкі до радіації клітини R-типу.

З іншого боку, цитологічний аналіз клітинних популяцій пухлини виявив появу на етапах вироблення РР різноманітних генетичних (хромосомні і хроматидні ушкодження) і епігенетичних змін, насамперед різноманітних форм клітинної кооперації. Аналізуючи весь комплекс особливостей, які характеризують РР, ми спробували оцінити питому вагу кожного параметра. Одержані дані дозволили виділити 17 істотних цитологічних ознак, що наростають при формуванні РР у популяції пухлинних клітин. Розташувавши ознаки за їх значущістю і частотою виявлення, ми спробували сформулювати алгоритм, який дозволяє з певною ймовірністю диференціювати радіочутливі й РР пухлинні клітини [6]. На першому етапі роботи над алгоритмом були виділені 8 найбільш постійних основних ознак з 17, які надійно тес-

тують прояв клітинної РР. Виявлено кількісні значення ознак, що відповідають стану невисокої, а також високої РР (відповідно значенням у 3–5 і 7–12 генераціях). Використання 8 ознак, особливо в їх сукупності, дозволяє надійно тестувати стан РР, а 5 з цих ознак придатні для кількісної оцінки ступеня РР. За допомогою математичного підходу ми змогли внести корективи у перший варіант алгоритму, які зробили його більш вірогідним та інформативним.

Отримані нами дані дозволяють підкреслити кілька фундаментальних рис процесу формування РР, що характеризують пухлину як адаптивну живу систему, якій властива значна міра автономності від організму. Адаптивні зміни в новоутворі під впливом багаторазового курсового радіаційного впливу (багатоетапного селективного відбору) розвиваються хвилеподібно, мають коливальний характер і в разі припинення променевої дії можуть поступово зменшуватися, з тенденцією повернення до початкового стану пухлини (умови і параметри оборотності процесу підлягають спеціальному самостійному дослідженню).

Співвідношення нормальних і патологічних мітозів у контролі й дослідах свідчить про те, що при виробленні РР кількість патологічних мітозів збільшується в 4–5 разів, що можна розглядати, з одного боку, як вияв формування певних ознак у ході адаптивно-приспосувальної реакції клітинного радіаційного стресу, а з іншого — як наслідок розділення клітинної популяції на потенційно нежиттєздатні і клітини, що переживають шкідливу дію, являючи собою базу для селективного відбору і формування фонду РР.

Перелічені селективні ознаки РР доводять існування вираженої гетерогенності всередині кожної популяції, а також свідчення її мінливості від покоління до покоління (у ході багаторазового селективного відбору), результатом чого і є пристосування клітин до жорсткіших умов середовища, тобто формування стійкості, зокрема, до опромінювання.

Динамічні гістологічні, цитокінетичні, математичні й інші дослідження дозволили виділити і оцінити низку субклітинних, клітинних і тканинних механізмів, що забезпечують формування РР пухлини.

Одержані нами дані в поєднанні з тими, що існують у літературі, дозволяють оцінювати надбану РР, її формування у відповідь на вплив радіаційного фактора із загальнобіологічних позицій. Клітинну систему пухлини можна розглядати як результуючу певної риси еволюції — пристосування клітинного клону (клонів) у відповідь на вплив екстремальних агентів, з іншого боку, променевий вплив являє собою дуже сильний фактор клітинного відбору на стійкість — РР. Нарешті, радіація виступає як фактор порушення, перебудови клітинного стереотипу, який склався у пухлині. Знання механізмів РР пухлини, її клітинних елементів відкриває перспективи цілеспрямованого, обґрунтованого, і тому більш ефективного, втручання в девіталізуючий процес з метою подолання набутої стійкості до йонізуючої радіації і забезпечення загального максимального ефекту протипухлинної терапії. Ми вбачаємо пряму кореляцію між індукцією РР і радіоадаптивною відповіддю.

У наших дослідженнях нестабільність у геномі РР клітин доведено підвищенням кількості аберантних мітозів, збільшенням сфероїдоутворення, анеуплоїдії і гетерогенності за розмірами клітин і ядер, зміною показників проліферативної активності та іншим. Отримані в динаміці формування РР дані — збільшення гетерогенності, поліморфізму, атипії пухлинних клітин, виражені репаративні реакції й інші процеси, які забезпечують виживання клітин — ланцюг послідовних реакцій, що мають пристосувальне значення. Ці дані підтверджують теорію, висунуту Г.С. Календо [8], про те, що в клітинній популяції функціонує механізм регуляції, який охоплює низку спеціалізованих систем: стабілізації, що підтримує в припустимих межах основні показники життєдіяльності популяції клітин; рецепторів — «сторожову охорону», або систему сигналізації, яка реагує на появу несприятливих умов і вмикає механізм охоронного гальмування (аварійного захисту) [9].

Таким чином, отримані нами результати можна розглядати як прояви пластичності геному пухлинних клітин, ступінчастого стабілізуючого відбору на РР і адаптивної відповіді клітин на багаторазовий курсовий вплив іонізуючої радіації.

ВИСНОВКИ

1. Отримано РР-штами — варіанти карциноми Герена та лімфосаркоми Плісса щурів і клітин L₉₂₉ у культурі *in vitro*, придатні для вивчення феномену РР. Одержані штами за особливостями росту, морфології і метаболізму відрізнялися від диких штамів.

2. До морфологічних відмінностей належать наростання поліморфізму клітин, ядер, ядерцець, мембранних структур. У популяції клітин карциноми Герена доведено існування не менше двох субпопуляцій, що істотно відрізняються за характеристиками росту і радіочутливості. На етапах вироблення РР істотно зростає внутріпопуляційна гетерогенність пухлинних клітин і мінливість між генераціями РР пухлин.

3. При аналізі морфологічного матеріалу виділено 17 ознак набутої РР, що можуть мати універсальний характер. Найтипівіші з них 5 ознак, придатних для об'єктивної характеристики ступеня РР пухлин.

Подяка

Щиро дякуємо завідувачеві відділу біохімічної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України професорові О.П. Соломко за цінні поради при обговоренні роботи та допомогу в її підготовці.

Література

1. Лобко Г.Н., Порубова Г.М. *Резистентность опухолей: генетические аспекты*. — Минск: Наука и техника, 1989. — 143 с.
2. Ueda R., Yoshida A., Amachi T. // *Anti-Cancer Drug Design*. — 1999. — Vol. 14, № 1. — P. 115–121.
3. Кулик Г.И., Чехун В.Ф., Лукьянова Н.Ю. // *Вопр. онкол.* — 2000. — Т. 46, № 2. — С. 121–127.
4. Сергеев П.В., Семейкин А.В., Федотчева Т.А., Шимановский Н.Л. // *Вопр. биол., мед. и фармацевт. химии*. — 2002. — № 3. — С. 10–17.
5. Зінченко В.А., Барабой В.А., Коваленко Л.С., Лук'янова Н.Ю. // *УРЖ*. — 1997. — Т. V, вип. 2. — С. 160–161.
6. Зінченко В.А., Ганина К.П., Петунин Ю.И. и др. // *Эксперим. онкол.* — 1999. — Т. 21, № 2. — С. 30–37.
7. Зінченко В.А., Соляник Г.І., Барабой В.А., Кулик Г.І. // *УРЖ*. — 1995. — Т. III, вип. 4. — С. 364–365.
8. Календо Г.С. *Ранние реакции клеток на ионизирующее излучение и их роль в защите и сенсбилизации*. — М.: Энергоатомиздат, 1982. — 96 с.
9. Тырси́на Е.Г., Календо Г.С., Сланина С.В. // *Радиац. биол. Радиоэкол.* — 1997. — Т. 37, вып. 2. — С. 207–212.

Надходження до редакції 02.06.2006.

Прийнято 17.08.2006.

Адреса для листування:

Зінченко Валентина Андріївна,
6-р Лесі Українки, 11, кв. 20, Київ, 01033, Україна