

О.П. Лукашова,
Н.А. Мітряєва,
С.М. Пушкар

ДУ Інститут медичної
радіології ім. С.П. Григор'єва
АМН України, Харків

Ультраструктура клітин карциноми Герена після застосування хемопрепаратів і локального опромінення пухлини

Ultrastructure of Guerin's carcinoma cells
after chemotherapy and local tumor irradiation

Цель работы: Изучение патоморфоза клеток карциномы Герена на ультраструктурном уровне после применения цисплатины и таксотера при локальном фракционированном облучении опухоли.

Материалы и методы: С помощью стандартных электрономикроскопических методик изучена ультраструктура клеток карциномы Герена после однократного введения цисплатины (ЦП) в дозе 6 мг/кг и таксотера (ТТ) в дозе 8 мг/кг с последующим локальным фракционированным стандартным рентгеновским облучением в суммарной дозе 10 Гр.

Результаты: Установлено, что введение ЦП приводит к выраженным нарушениям ультраструктуры клеток карциномы Герена и не влияет на показатель количества митозов в опухоли. Основным эффектом ТТ является достоверное снижение митотической активности в опухоли на фоне незначительного изменения ультраструктуры ее клеток. Применение ЦП с последующим облучением мало изменяет структурно-функциональное состояние клеток карциномы Герена, тогда как введение таксотера перед облучением приводит к некрозу опухолевой ткани и резкому достоверному уменьшению числа митозов в выживших клетках.

Выводы: Цисплатина вызывает выраженный ультраструктурный патоморфоз клеток карциномы Герена, не влияя на процессы деления в опухоли; ТТ достоверно тормозит деление клеток в опухолевой ткани, не вызывая заметных нарушений ультраструктуры ее клеток; ЦП не обладает радиосенсибилизирующими свойствами в отношении карциномы Герена; ТТ является активным радиосенсибилизатором, значительно потенцируя действие облучения на карциному Герена; различные радиомодифицирующие эффекты ЦП и ТТ могут быть связаны с их влиянием на процессы деления.

Ключевые слова: ультраструктура, карцинома Герена, облучение, цисплатина, таксотер.

Objective: To study ultrastructural pathomorphism of Guerin's carcinoma cells after administration of cisplatin and Taxotere at local fractionated irradiation of the tumor.

Material and Methods: Standard electron microscopy was used to investigate Guerin's carcinoma cell ultrastructure after single administration of cisplatin (CP) at a dose of 6 µg/kg and Taxotere (TT) at a dose of 8 µg/kg followed by local fractionated standard x-ray irradiation at a total dose of 10 Gy.

Results: It was established that administration of CP resulted in pronounced disorders in Guerin's carcinoma cell ultrastructure and did not influence the number of mitoses in the tumor. Main effect of TT was significant reduction of mitotic activity in the tumor against a background of inconsiderable changes in the cell ultrastructure. Administration of CP followed by irradiation changed little in the structural functional state of Guerin's carcinoma cells while Taxotere administration prior to irradiation caused necroses of the tumor tissue and significant reduction of the number of mitoses in the survived cells.

Conclusion: Cisplatin causes pronounced ultrastructure pathomorphism in Guerin's carcinoma cells not influencing the processes of division in the tumor. TT inhibits cell division in the tumor tissue without visible changes in the cell ultrastructure. CP does not possess radiosensitizing properties as to Guerin's carcinoma. TT is an active radiosensitizer considerably potentiating the effect of irradiation on Guerin's carcinoma. Various radiomodifying effects of CP and TT can be associated with their influence on division processes.

Key words: ultrastructure, Guerin's carcinoma, irradiation, cisplatin, Taxotere.

Однією з актуальних проблем онкології є лікування місцево-поширених форм раку, коли хірургічне втручання неможливе. Це пов'язане з тим, що рак III–IV стадії діагностується у великому проценті випадків серед уперше виявлених онкозахворювань. Так, в Україні у 2005 році для всіх злоякісних новоутворів ця цифра складає — 34,8 %, для раку легень

(РЛ) — 69,3 %, шлунка — від 55,0 %, грудної залози — 24,5 % [1]. В цілому щороку в Україні реєструється майже 25 тисяч хворих з III–IV стадією процесу [2].

Основними методами терапії неоперабельних форм раку є хемо- та променева терапія (ПТ). Проте лікування значно ускладнюється тим, що найефективніші препарати високоток-

сичні, а деякі з пухлин виявляються резистентними до дії радіації. Це диктує необхідність пошуку таких схем хемопроменевої терапії, при яких можливим стає потенціювання дії обох факторів при одночасному зниженні терапевтичних доз препаратів [3].

Останнім часом в антибластомній терапії з метою підвищення радіочутливості пухлини застосовують різні радіосенсибілізатори, серед яких такі досить ефективні хемопрепарати, як цисплатина та таксотер. Дані літератури свідчать, що використання цисплатини при недрібноклітинному РЛ демонструє зниження ризику смерті у хворих, які одержували препарат при ПТ, порівняно з дією лише опромінення [4]. Введення таксотеру при комбінованому хемопроменевому лікуванні раку грудної та щитоподібної залози приводить до вираженого протипухлинного ефекту [5, 6].

Особливе місце у вивченні дії хемо- та променевого факторів посідають експериментальні дослідження, які дозволяють встановити модифікуючий вплив препаратів на клітини злоякісних пухлин, зокрема, досить радіорезистентних штабів. Проте дослідженням тонкої будови пухлинних клітин у таких умовах приділяється недостатньо уваги, хоча вивчення ультраструктури може принести додаткові дані для з'ясування механізмів впливу на пухлини різних хемопрепаратів та їх комбінації з опроміненням.

Отже метою даної роботи стало вивчення патоморфозу клітин карциноми Герена на ультраструктурному рівні після застосування цисплатини та таксотеру при локальному фракційному опроміненні пухлини.

Методика дослідження

Експерименти було проведено на 42 щурах лінії Вістар з масою тіла 180–200 г з перещепленою карциномою Герена. Локальне фракційне рентгенівське опромінення пухлини проводили на апараті РУМ-17 за стандартних технічних умов: напруга — 190 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри — 0,5 мм Cu, 1 мм Al у сумарній дозі 10 Гр (по 5 Гр на фракцію з інтервалом 24 години).

Препарати вводили внутріочеревинно: цисплатину — у дозі 6 мг/кг, а таксотер — 8 мг/кг маси тіла за 24 години до першого сеансу опромінення.

Тварин розподіляли на 6 груп:

- 1 — контроль (інтактна пухлина);
- 2 — локальне фракційне рентгенівське опромінення у сумарній дозі 10 Гр;
- 3 — введення цисплатини у дозі 6 мг/кг маси тіла;

4 — введення таксотеру у дозі 8 мг/кг маси тіла;

5 — введення цисплатини у дозі 6 мг/кг маси тіла з наступним опроміненням у вказаних умовах;

6 — введення таксотеру у дозі 8 мг/кг маси тіла з наступним опроміненням у вказаних умовах.

Щурів декапітували з дотриманням правил евтаназії через 24 години після останнього сеансу опромінення, а у групах з уведенням препаратів без додаткового опромінення — за 24 години після ін'єкції.

Матеріал для ультраструктурних досліджень обробляли за стандартними електронномікроскопічними методами [7]. Кусочки пухлини без ознак некрозу витримували спочатку у глютаральдегідному фіксаторі за Карновським, потім фіксували в 1 % -му тетраоксиді осмію за Паладе. Після зневоднювання в етанолі зростаючої концентрації та абсолютному ацетоні матеріал заливали у суміш епоксидних смол (епон-аралдит) і полімеризували 36 годин при 56 °С. Напівтонкі та ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамікромомі УМТП-4 Сумського ВО «Електрон» (Україна). Напівтонкі зрізи забарвлювали метиленовим синім і підраховували кількість мітозів у полі зору світлового мікроскопа МБІ-6 (окуляр × 10, об'єктив × 20, біокуляр × 2,5). Одержані дані опрацьовували статистично за допомогою пакета програм Statistica v. 6.0 для IBM.

Ультратонкі зрізи контрастували в насиченому розчині ураніл ацетату та цитрату свинцю за Рейнольдсом і аналізували в електронному мікроскопі ЕМ-125 (Сумське ВО «Електрон», Україна).

Результати та їх обговорення

Як відомо, в інтактній карциномі Герена переважають недиференційовані та низькодиференційовані пухлинні клітини, розташовані полями або великими гніздами, навколо яких виявляються ділянки некрозу. Ядра пухлинних клітин округлі, іноді зі звивистим контуром, містять грудкуватий хроматин, великі чіткі ядерця. В цитоплазмі розташовуються численні вільні рибосоми та полісоми, невеликі округлі профілі гранулярної ендоплазматичної сітки (гЕПС), заповнені темною білковою субстанцією, мітохондрії, окремі прозорі вакуолі, лізосоми, а в деяких випадках — ліпідні краплини поодинокі та групами. Спостерігаються також клітини, що мітотично діляться, та одиничні клітини, які перебувають у стані апоптозу, з ядрами характерного вигляду. Хроматин у них перетворюється на щільні темні маси, розташовані на периферії, ядерний матрикс просвітлюється, цитоплазма фрагментується.

Слід зазначити, що карцинома Герена — це досить радіорезистентна пухлина [8], тому через добу після опромінення у сумарній дозі 10 Гр ультраструктура більшості клітин майже не відрізняється від тієї, що спостерігається в інтактній карциномі. Вірогідно не змінюється також їх мітотична активність (табл. 1).

Число мітозів у полі зору в ділянках життєздатних клітин карциноми Герена після застосування хемопрепаратів та фракційного рентгенівського опромінення
The number of mitoses in the field of vision in the areas of viable cells of Guerin's carcinoma after administration of chemotherapy and fractionated x-ray exposure

Серія	Цисплатина		Таксотер	
	n	X ± Sx	n	X ± Sx
Інтактна пухлина	13	1,69 ± 0,47		
Опромінення	30	1,37 ± 0,26		
Введення хемопрепарату	13	1,85 ± 0,37	12	0,61 ± 0,28 *
Введення хемопрепарату та опромінення	17	1,00 ± 0,28	12	0,33 ± 0,19 * **

Примітка. * — вірогідно порівняно з інтактною пухлиною; ** — з опроміненням.

Лише в поодиноких випадках виявляється спотворення ядра та з'явлення фагосом у цитоплазмі (рис. 1).

Дослідження ультраструктури клітин карциноми Герена через 24 години після введення хемопрепаратів демонструє їх різну реакцію на діючий чинник. Так, застосування цисплатини у дозі 6 мг/кг призводить до помітних порушень тонкої будови пухлинних клітин за 24 год після введення. На фоні високої мітотичної активності (табл. 1) виникають патологічні мітози (рис. 2), ядра спотвореної форми та фрагментовані, в яких кількість фрагментів сягає 7–8 (рис. 3), двоядерні клітини. Різко зростає кількість клітин у стані апоптозу, причому цей процес спостерігається навіть у фрагментованих ядрах (рис. 4). Значно активується фагоцитоз у пухлинних клітинах. Виявляються також групи клітин, у цитоплазмі яких містяться численні вакуолі. Все це вказує на значну протипухлинну ефективність цисплатини, для якої основною мішенню є ядро, оскільки препарати платини зв'язуються з ДНК [9], що може приводити до порушення її структури та загибелі пухлинних клітин шляхом апоптозу.

На відміну від цього через 1 добу після ін'єкції таксотеру в дозі 8 мг/кг більшість пухлинних клітин представлена формами, ультраструктура яких відповідає нормі (рис. 5). Лише в деяких з них містяться розширені профілі гЕПС, вакуолі, заповнені дрібногранулярною субстанцією, гіпертрофованій комплекс Гольджі, що вказує на диференціацію цих клітин зі зростанням білковосинтетичної активності, іноді фагосоми (рис. 6). Ядра окремих клітин набувають чудернацького вигляду, фрагменту-

ються. Зрідка трапляються двоядерні та клітини у стані апоптозу. Проте кількість тих, що мітотично діляться, різко та вірогідно знижується (див. табл. 1). Це відповідає даним літератури про те, що таксотер блокує поділ клітин на межі G₂ та М-фаз клітинного циклу [10].

У серіях, де препарати вводили за 24 год до фракційного опромінення в сумарній дозі 10 Гр, спостерігалася зовсім інша картина. Так, ультраструктура пухлинних клітин після одноразової ін'єкції цисплатини та наступного опромінювання не мала тих порушень, які відзначалися за 24 години після застосування одного хемопрепарату. Спостерігається лише спотворення і фрагментація деяких ядер, розширення цистерн гЕПС в окремих клітинах, наявність в поодиноких випадках у цитоплазмі вакуолей, фагосом та ліпідних краплин. Мітотична активність перебуває в межах коливань норми і невірогідно відрізняється від цього показника в серії з лише опроміненням (див. табл. 1). Тільки процеси апоптозу при цих умовах виражені досить помітно (рис. 7).

Водночас опромінювання пухлини після застосування таксотеру призводить до фатальних наслідків. Основний об'єм пухлини складає некротизована тканина, а життєздатні клітини розташовуються невеликими скупченнями лише навкруги судин. Більшість з них мають майже нормальну будову і тільки в поодиноких — виявляються відхилення ультраструктури: спотворення форми ядра, наявність у цитоплазмі окремих вакуолей, фагосом (рис. 8), ліпідних краплин, розширених цистерн гЕПС, явища апоптозу. Проте процеси поділу достовірно гальмуються як порівняно

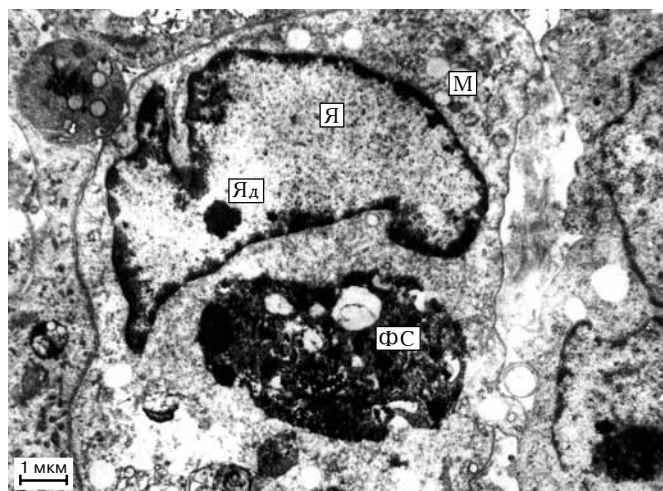


Рис. 1. Пухлинна клітина з ядром чудернацької форми та великою фагосою у цитоплазмі після опромінування карциноми Герена: Я – ядро; Яд – ядрце; М – мітохондрія; ФС – фагосома

Fig. 1. The tumor cell with a strange nucleus and a large phagosome in the cytoplasm after irradiation of Guerin's carcinoma: Я - nucleus; Яд - nucleolus; М - mitochondria; ФС - phagosome

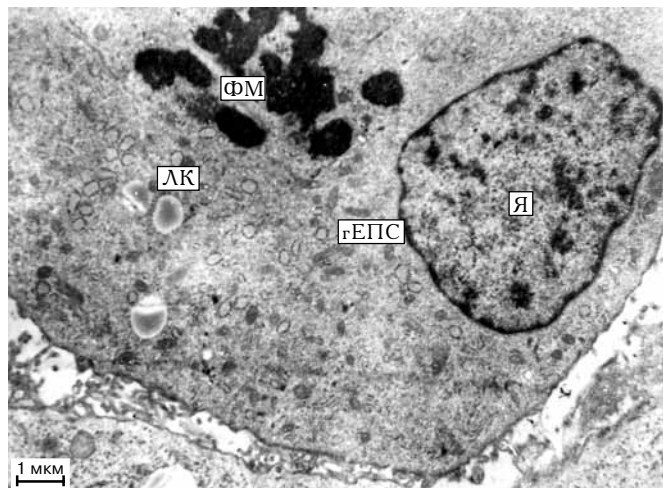


Рис. 2. Патологічний мітоз у пухлинній клітині після введення цисплатини; ФМ – фігура мітозу; ЛК – ліпідна краплина; гЕПС – гранулярна ендоплазматична сітка

Fig. 2. Pathological mitosis in the tumor cell after cisplatin administration: ФМ - mitosis figure; ЛК - lipid drop; гЕПС - granular endoplasmic reticulum

з групою інтактного контролю, так і групою лише опромінених пухлин (табл. 1).

Таким чином, проведені дослідження показали, що пухлина Герена дуже чутлива до дії цисплатини, введення якої вже за 24 години призводить до виражених пошкоджень ядерного апарату пухлинних клітин і зростання апоптичної загибелі, тоді як наступне опромінення після введення цисплатини повністю нівелює його дію, а ультраструктура більшості клітин майже не відрізняється від тієї, що спостерігається при дії тільки радіаційного фак-

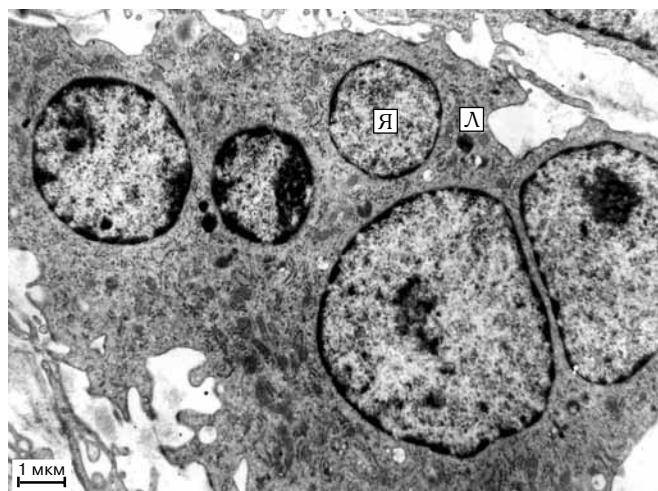


Рис. 3. Фрагментоване ядро у пухлинній клітині після введення цисплатини; Л – лізосома

Fig. 3. Fragmented nucleus in the tumor cell after cisplatin administration: Л - lysosome

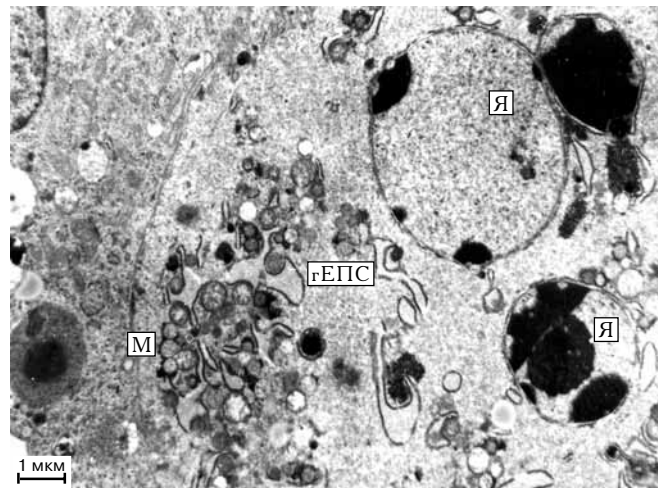


Рис. 4. Апоптоз у пухлинній клітині з фрагментованим ядром після введення цисплатини

Fig. 4. Apoptosis in the tumor cell with a fragmented nucleus after cisplatin administration

тора, за винятком активації процесів апоптозу. Можна припустити, що в цьому феномені певну роль відіграють властивості цисплатини. Цей препарат не блокує мітотичну активність, а навіть її підвищує і не призводить до радіо-сенсibilізації клітин карциноми Герена, стимулює апоптоз і, очевидно, діє короткочасно. У зв'язку з цим можна уявити такий сценарій розвитку подій. Введення цисплатини приводить до пошкоджень у пухлині Герена і дещо активізує процеси поділу. Без додаткових доз препарату протягом 3 діб, які минають від мо-

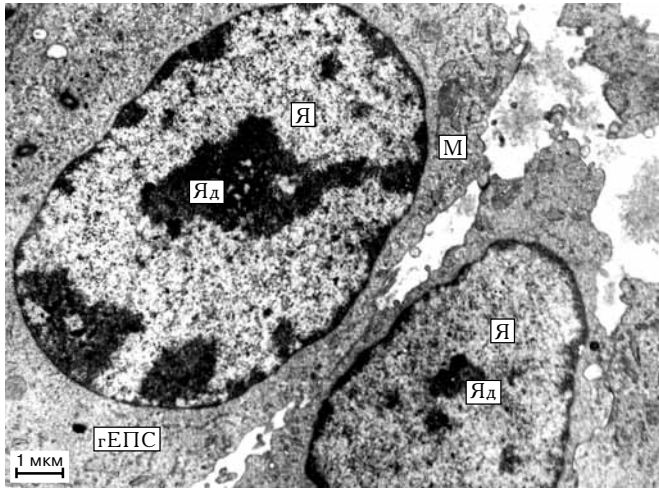


Рис. 5. Пухлинні клітини нормальної будови після введення таксотеру

Fig. 5. Tumor cells with a normal structure after Taxotere administration

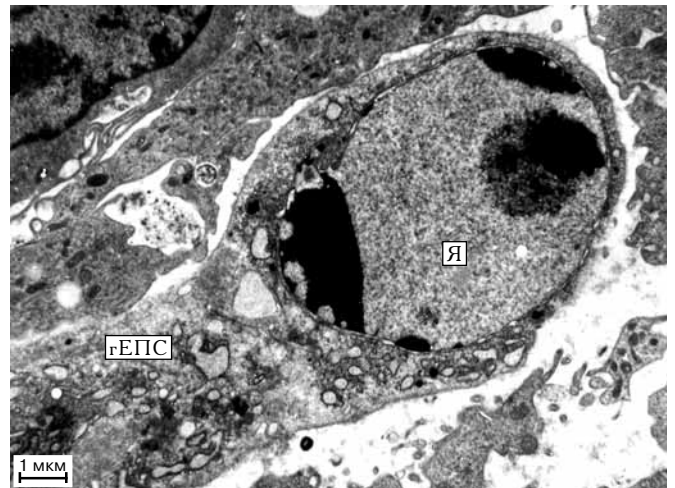


Рис. 7. Пухлинна клітина у стані апоптозу після сумісного застосування цисплатини та опромінювання

Fig. 7. A tumor cell in the stage of apoptosis after simultaneous use of cisplatin and irradiation

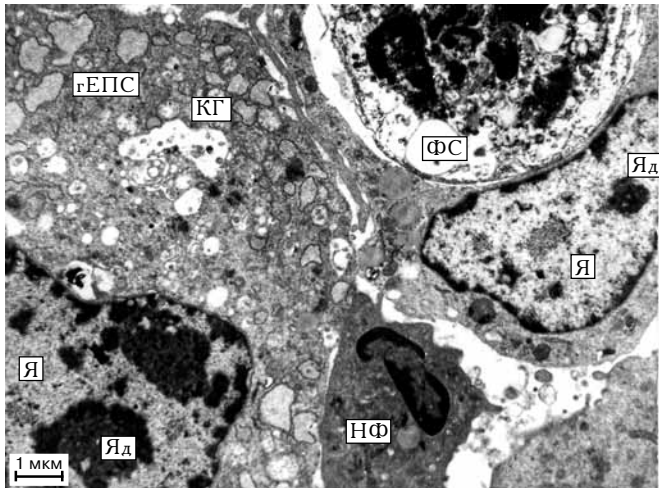


Рис. 6. Пухлинна клітина з розширеними цистернами гЕПС і гіпертрофованим комплексом Гольджи після введення таксотеру. Поряд — клітина з великою фагосою у цитоплазмі, між клітинами — нейтрофільний лейкоцит. НФ — нейтрофільний лейкоцит, КГ — комплекс Гольджи

Fig. 6. A tumor cell with dilated cisterns of granular endoplasmic reticulum and hypertrophic Golgi complex after Taxotere administration. Near it, there is a cell with a large phagosome in the cytoplasm, between the cells there is neutrophilic leukocyte. НФ - neutrophilic leukocyte, КГ - Golgi complex

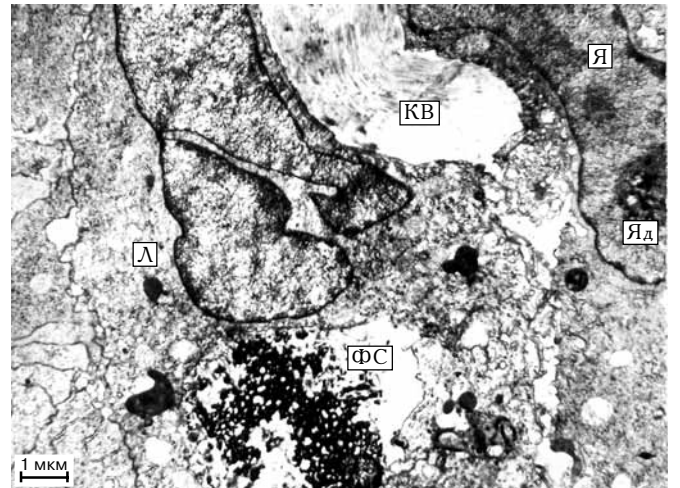


Рис. 8. Пухлинна клітина зі спотвореним ядром і великою фагосою після сумісного застосування таксотеру та опромінювання. У міжклітинному просторі пучок колагенових волокон. КВ — колагенові волокна

Fig. 8. A tumor cell with an abnormal nucleus and a large phagosome after simultaneous use of Taxotere and irradiation. In the intercellular space there is a band of collagen fibers. КВ - collagen fibers

менту ін'єкції до забивання тварин, тканина карциноми звільнюється від необоротно уражених клітин шляхом апоптозу, а досить висока мітотична діяльність компенсує їх втрату. Оскільки цисплатина не підвищує радіочутливості пухлини, дія опромінення викликає ті ж самі зміни, що й за відсутності препарату.

При застосуванні ж таксотеру основним стає блокування клітинного циклу на фоні незначних змін ультраструктури карциноми Герена,

а сумісна дія цього препарату й випромінювання призводить до загибелі переважної більшості пухлинних клітин. У цьому випадку, очевидно, таксоцер не тільки гальмує процеси поділу, але й виражено і тривало сенсibiliзує клітини карциноми до дії радіації, що приводить їх до загибелі при наступних курсах опромінення, а низький рівень мітотичної активності не дає можливості відбуватися процесам поновлення.

ВИСНОВКИ

1. Цисплатина викликає виражений ультрароструктурний патоморфоз клітин карциноми Герена, не впливаючи на процеси поділу в пухлині.

2. Таксотер вірогідно гальмує поділ клітин у пухлинній тканині, не викликаючи помітних порушень ультраструктури її клітин.

3. Цисплатина не має радіосенсибілізуючих властивостей стосовно карциноми Герена.

4. Таксотер є ефективним радіосенсибілізатором, оскільки значно потенціює дію опромінення на карциному Герена.

5. Різний радіомодифікуючий ефект цисплатини та таксотеру може бути пов'язаний із їх впливом на процеси поділу.

Література

1. *Рак в Україні 2004–2005. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби // Бюл. нац. канцерреєстру України. — К., 2006. — № 6.*
2. *Бриндіков Л.М., Закрижевський В.М., Закрижевська Т.В. та ін. // УРЖ. — 2005. — Т. XIII, вип. 3. — С. 267–268.*
3. *Іванкова В.С. Онкопатологія: проблеми та перспективи лікування // Там же. — С. 300–302.*
4. *Nakano K., Kitagaki K., Ishida H. et al. // Gan To Kagaku Rioho. — 1996. — Vol. 23, № 1. — P. 57–61.*
5. *Сімонова Л.І., Мітряєва Н.А., Тарасова О.М. та ін. // УРЖ. — 2005. — Т. XIII, вип. 3. — С. 388–391.*
6. *Горбенко В.М., Белозер Н.В., Бутенко К.А. та ін. // Там же — С. 284–285.*
7. *Electron microscopy in biology. A practical approach / Ed. by J.R. Harris. — New York: Oxford University Press, 1991. — 308 p.*
8. *Лукашова О.П., Міхановський О.А. // УРЖ. — 2007. — № 3. — С. 344–351.*
9. *Гроховский С.Л., Зубарев В.Е. // Докл. АН СССР. — 1990. — Т. 313, № 6. — С. 1500–1504.*
10. *Tishler R.B., Schiff P.B., Geard C.R. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. — 1992. — Vol. 22. — P. 613–617.*

Надходження до редакції 25.05.2007.

Прийнято 03.07.2007.

Адреса для листування:
Лукашова Ольга Петрівна,
ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва АМНУ,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна