



В. П. Старенький

ГУ «Институт медицинской радиологии НАМН Украины», г. Харьков

© Старенький В. П.

УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ ХИМИОРАДИОМОДИФИКАЦИИ ТАКСОТЕРОМ

Резюме. Изучены ультраструктурные изменения органелл опухолевых клеток больных с немелкоклеточным раком легкого после традиционной лучевой терапии. Показано, что в популяции клеток присутствовало большое количество метаболически активных клеток. Проведение химиолучевой терапии с применением таксотера приводит к более глубоким деструктивным нарушениям субмикроскопической архитектоники опухолевых клеток. Предоперационное облучение с таксотером, сопровождается выраженными характеристиками лучевого патоморфоза и приводит к необратимому поражению ультраструктур клеток различных гистологических форм рака лёгких.

Ключевые слова: рак легкого, ультраструктура опухолевых клеток, химиолучевая терапия, таксотер.

Введение

Гистоморфологическое исследование и, в частности, электронная микроскопия, до настоящего времени остается не только краеугольным камнем диагностики и стадирования злокачественного процесса, но и объективным методом определения степени ответа тканей на терапевтическое воздействие [3]. По мнению ряда авторов, лучевые и клинические методы, предоставляя ценную информацию, все же не дают полную характеристику ответа опухоли на лечение и должны быть дополнены гистологической оценкой эффективности на терапевтическое воздействие, реализуемое в том числе через активацию апоптоза [1, 2, 4].

Исследования последних лет показали [5, 7], что цитостатическое действие большинства противоопухолевых препаратов и лучевая терапия реализуются путем индукции апоптоза, независимо от конкретного механизма действия каждого из них. Развитие резистентности к противоопухолевой терапии, возможно, связано с факторами, влияющими на апоптоз. Многочисленные работы свидетельствуют о том, что патогенез многих болезней, в том числе и рака, связан с неспособностью клеток подвергаться апоптозу [6, 8]. В связи с этим, поиск путей индукции апоптоза при лечении онкологических больных, в частности, при лучевой терапии, является актуальной задачей онкологии.

Цель исследования

Выявить особенности ультраструктурных перестроек клеток немелкоклеточного рака легкого больных получавших в предоперационном периоде лучевую терапию с таксотером.

Материалы и методы исследований

Методом электронной микроскопии была изучена субмикроскопическая организация опухолевых клеток 5 случаев (3 плоскоклеточных и 2 аденокарциномы) рака лёгких пациентов после химиолучевой терапии, в состав которой входил таксотер. Контролем служили опухоли 10 больных (5 плоскоклеточный рак и 5 аденокарциноме).

Для электронно-микроскопического исследования производился субоперационный забор кусочков ткани опухоли, которые сразу после иссечения помещали для предварительной фиксации в 2,5 % забуференный раствор глутарового альдегида на 3-7 часов при температуре 4-5 °С. После окончания предварительной фиксации ткань промывали в буферном растворе и переносили для окончательной фиксации 1 % забуференный раствор четырехокси осмия на 2-3 часа при температуре 4 °С. После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, ткань пропитывали в смеси эпоксидных смол (эпон-аралдит) и заключали в блоки по общепринятым методикам. Полимеризацию блоков проводили в термостате при температуре 60 °С в течение 2-х суток.

Из полученных блоков, на ультрамикротоме УМТП-3 изготавливали ультратонкие срезы, которые после контрастирования цитратом свинца и уранил ацетатом изучали под электронным микроскопом ЭМВ-100БР при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты электронно-микроскопического исследования ультраструктуры опухолевых клеток больных, которым лучевая терапия



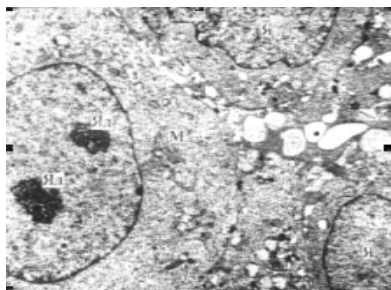
проводилась без введения таксотера дают возможность говорить об общей низкой радиочувствительности немелкоклеточного рака легкого.

Было установлено, что в контрольной группе больных ультраструктура опухолевых клеток низко дифференцированного плоскоклеточного рака легкого отличалась полиморфизмом. В опухолевой ткани преобладали клетки со светлыми ядрами, содержащими деконденсированный хроматин и 1-2 сетчатых ядрышка (рис. 1 а).

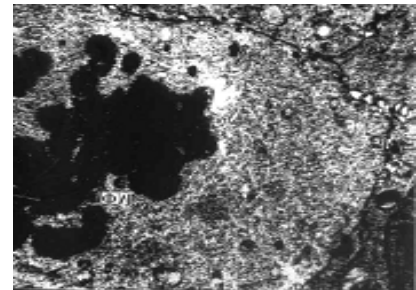
Цитоплазма опухолевых клеток была заполнена многочисленными рибосомами и полисомами. В цитоплазме небольшое количество

митохондрий, цистерн шероховатой эндоплазматической сети, а также мелких липидных капель, лизосом и тонких пучков кератогиалиновых микрофибрилл. Матрикс митохондрий мелкозернистый средней электронной плотности. Кисты укорочены и дезорганизованы.

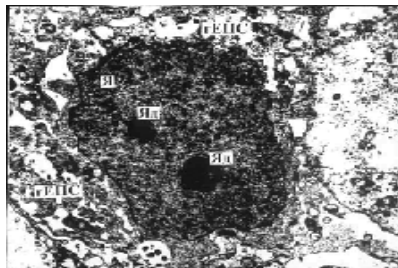
Такое состояние ультраструктуры органелл присуще клеткам, в которых интенсивно протекают белковосинтетические процессы, направленные в основном на выработку продукта для собственных нужд клеток, в частности, на рост и размножение, что структурно подтверждалось большим количеством митозов (рис. 1б).



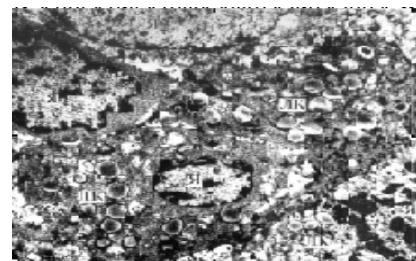
а



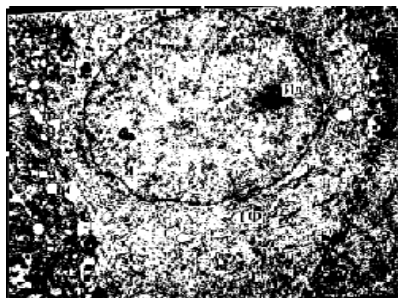
б



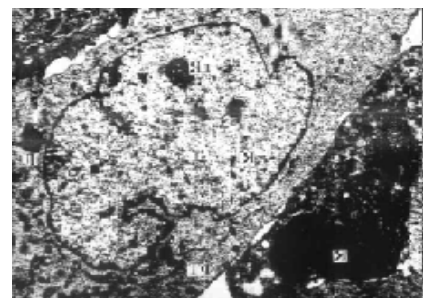
в



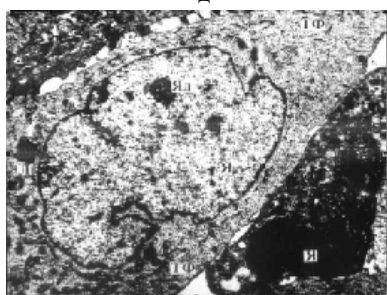
г



д



е



ж



з

Рис. 1 – Ультраструктура клеток плоскоклеточного рака: а – светлые ядра; б – митоз; в – расширенные цистерны шЭПС; г – включения митозов; д – кератогиалиновые микрофибриллы; е – светлые ядра уродливой формы; ж – плейоморфные ядра и аутофагосомы в цитоплазме; з – темная функционально неактивная клетка



Кроме того, в клеточной популяции опухолевой ткани встречались функционально малоактивные клетки с электронно плотным ядром и сильно расширенными цистернами шероховатого эндоплазматического ретикула (рис. 1в), а также группы темных клеток, цитоплазма которых заполнена большим количеством липидных включений, локализованных в области пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи подверженного редукции (рис. 1г).

В случаях плоскоклеточного рака с умеренной степенью дифференциации практически в каждой опухолевой клетке обнаруживаются кератогиалиновые микрофибриллы, которые были либо разбросаны по цитоплазме в виде отдельных волокон, иногда собранных в тонкие пучки (рис. 1д), либо собирались в электронно плотные образования удлинённой формы.

Часть клеток имела ядра с электронно прозрачным матриксом. Ядерная мембрана их образовывала многочисленные мелкие и глубокие инвагинации. В цитоплазме выявлялось много рибосом и полисом, а также присутствовали включения липидов, единичные митохондрии, расширенные цистерны шероховатой эндоплазматической сети и тонкие фибриллы (рис. 1е).

В отдельных опухолевых клетках наряду с плеоморфными ядрами и хорошо развитой шероховатой эндоплазматической сетью в цитоплазме выявляются толстые темные пучки кератогиалиновых волокон, первичные и вторичные лизосомы, а также аутофагосомы (рис. 1ж).

В некоторых из них расширенные цистерны шероховатой эндоплазматической сети заполнены мелко гранулярной белковой субстанцией низкой электронной плотности (рис. 1з).

При аденокарциноме опухоль состояла из однотипных клеток, соединенных друг с другом десмосомами. Их ядерная мембрана имеет множественные мелкие и глубокие инва-

гинации, а в матриксе располагались грубые глыбки гетерохроматина и иногда гигантские сетчатые ядрышки (рис. 2а, б). Цитоплазма часто была заполнена вакуолями неправильной формы (рис. 2а). Иногда в ней обнаруживались крупные фагосомы имеющие различную электронную плотность (рис. 2б).

В группе больных, которым проводилась химиолучевая терапия с использованием таксотера, во всех случаях наблюдалось значительное нарушение субмикроскопической архитектоники опухолевых клеток.

Иногда в препаратах обнаруживались тотально разрушенные клетки, окруженные нейтрофильными лейкоцитами (рис. 3а).

В опухолевой ткани одного больного сохранились скопления темных клеток, разделенных расширенными межклеточными промежутками. Эти клетки удерживались друг возле друга благодаря десмосомам (рис. 2б). Ядра таких клеток заполнены глыбками плотного конденсированного хроматина. При этом в цитоплазме обнаруживались органеллы подверженные тотальному разрушению.

Изредка в препаратах встречаются опухолевые клетки со светлыми плеоморфными ядрами и крупными темными осмиофильными ядрышками, в цитоплазме которых располагаются набухшие митохондрии с лизированными кристами (рис. 3в).

В материале из опухоли другого пациента среди волокон соединительной ткани наблюдаются участки некроза (рис. 3г) или единичные опухолевые клетки с плеоморфными ядрами и цитоплазмой, в которой практически отсутствовали органеллы.

Иногда ткань опухоли состояла из крупных светлых и темных опухолевых клеток, которые при световой микроскопии были схожи с интактными. Однако при электронномикроскопическом исследовании выявлено, что их органеллы были значительно поврежденными. Ядра части клеток имели аномально просветленный матрикс и очень плотные

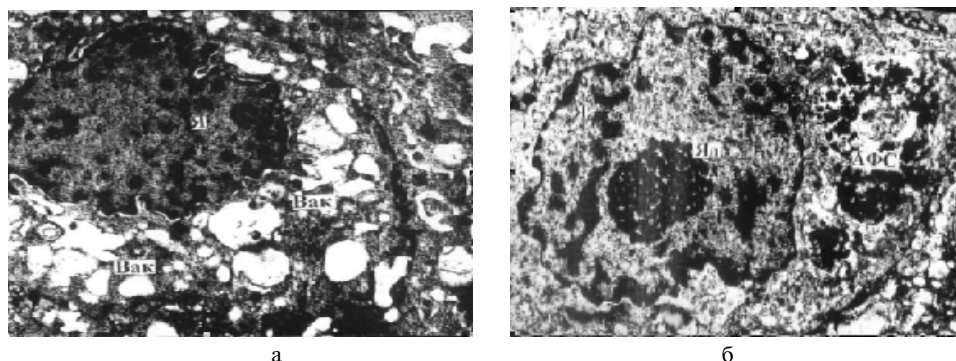


Рис. 2 – Ультраструктура клеток при аденокарциноме:
а – вакуолизация цитоплазмы; б – аутофагосомы в цитоплазме

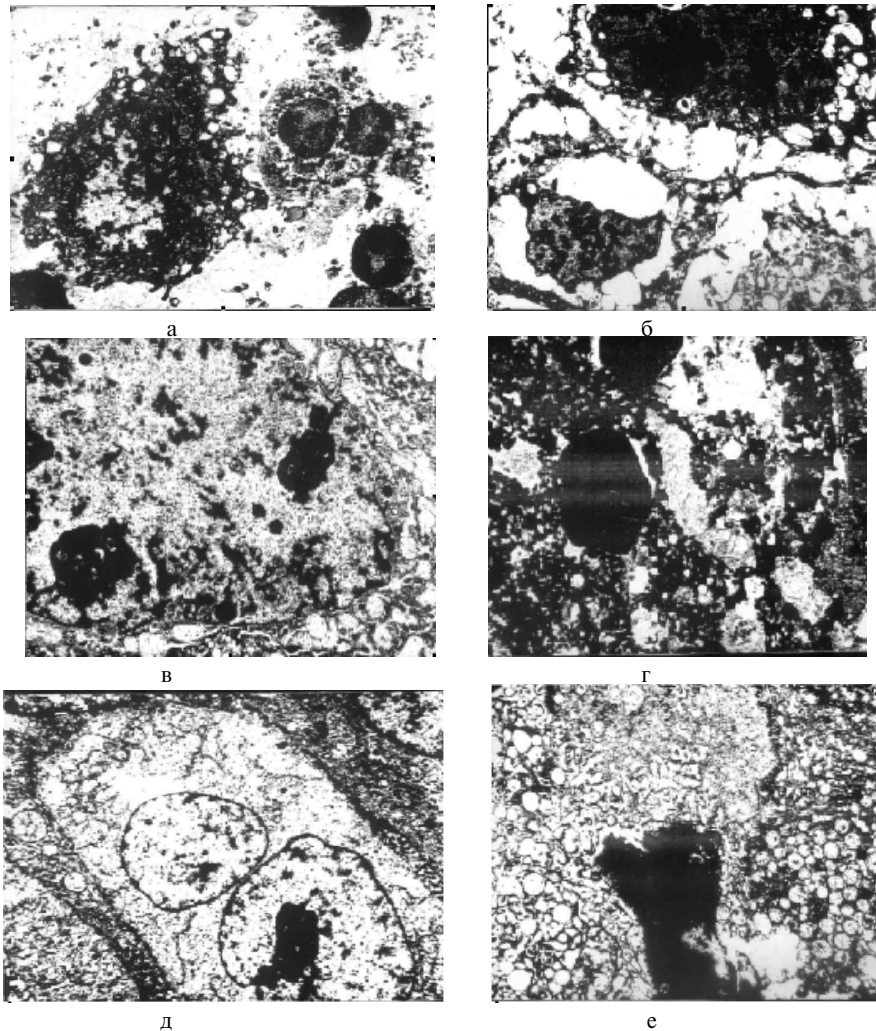


Рис. 3 – Ультраструктура клеток опухоли после химиолучевой терапии с использованием таксотера: *a* – деструкция органелл клеток; *б* – расширение межклеточных промежутков; *в* – конденсация хроматина ядра, деструкция крист митохондрий; *г* – некроз; *д* – пикноз ядра, просветление цитоплазмы, внутриклеточных мембранных структур; *е* – вакуолизация цитоплазмы

ядрышки. Цитоплазматический матрикс также просветлен, органеллы практически невозможно идентифицировать. В других клетках ядра пикнотичны, а цитоплазма вакуолизована (рис. 3д).

Проведенное электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры опухолевых клеток больных плоскоклеточным раком легких и аденокарциномой показало, что при лучевой терапии без введения таксотера в популяции клеток сохранялось довольно большое количество метаболически активных клеток. Структурным подтверждением этого является присутствие в цитоплазме большого количества рибосом и полисом, хорошо развитого шероховатого эндоплазматического ретикула и гипертрофированного пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи.

Наряду с этим у значительного количества опухолевых клеток обнаруживались деструктивные нарушения органелл, в виде очагового лизиса их наружных мембран. Нарушениям были подвержены ядерная мембрана,

мембраны шероховатого эндоплазматического ретикула. В области редуцированного пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи зачастую располагались вторичные лизосомы, что свидетельствовало об активации катаболических внутриклеточных процессов.

В группе больных, которым проводилась химиолучевая терапия с применением таксотера субмикроскопическая архитектура опухолевых клеток была подвержена значительным деструктивным нарушениям. У подавляющего количества опухолевых клеток наблюдались очаговые разрушения мембран митохондрий, ядерной мембраны и мембран шероховатой эндоплазматической сети. Наблюдалась редукция пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи и локализация в его близости вторичных лизосом и включений липидов, что является структурным подтверждением преобладания катаболических процессов над синтетическими. Опухолевые клетки подвергались внутриклеточным и внутриядерным



отёкам, что выражается в просветлении цитоплазмы и матрикса ядра.

Следует отметить, что значительная часть опухолевых клеток была подвержена тотальному лизису.

Таким образом, все вышеизложенное, позволяет сделать вывод о преимуществе нетрадиционного режима фракционирования дневной дозы лучевой терапии с химиомодификацией как относительно традиционного режима облучения, так и ускоренного облучения в самостоятельном виде. Несмотря на более высокую частоту выраженных гематологических реакций, отражающих фармакологические особенности химиопрепарата, а также реакций со стороны легочной ткани, переносимость ускоренного режима фракционирования с химиомодификацией можно считать в целом приемлемой при условии своевременной и адекватной симптоматической терапии.

Предоперационное облучение с таксотером сопровождается более выраженными характеристиками лучевого патоморфоза, как на клеточном, так и на субклеточном уровнях, что является важным вкладом в преодолении радиорезистентности немелкоклеточного рака лёгких.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что примененная схема химиолучевой терапии является достаточно эффективной и

приводит к необратимому поражению клеток различных гистологических форм рака лёгких.

Выводы

1. Анализ ультраструктурных изменений опухолевых клеток больных плоскоклеточным раком легких и аденокарциномой, которым лучевая терапия проводилась без введения таксотера, показал наличие в популяции большого количества метаболически активных клеток.

2. Проведение химиолучевой терапии с применением таксотера приводит к более глубоким деструктивным нарушениям субмикроскопической архитектоники опухолевых клеток. Разрушению подвергаются мембраны митохондрий, ядра, шероховатой эндоплазматической сети.

3. Предоперационное облучение с таксотером, сопровождающееся выраженными характеристиками лучевого патоморфоза как на клеточном, так и на субклеточном уровнях, является важным вкладом в преодолении радиорезистентности немелкоклеточного рака лёгких.

4. Полученные результаты свидетельствуют о том, что примененная схема химиолучевой терапии является достаточно эффективной и приводит к необратимому поражению клеток различных гистологических форм рака лёгких.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грибовой А. Н. Гистологическая оценка ответа опухоли на химиолучевую терапию / А. Н. Грибовой, Т. А. Тарасова, М. В. Кошубарова // Экспериментальные исследования, онкоморфология, онкоиммунология. — 2012 — № 6(2). — С. 138-142.

2. Оцінка хіміотерапевтичного патоморфозу недрібноклітинного раку легнів / О. А. Суховерша, І. В. Біленький, С. М. Чекан, В. А. Коссе // Морфология — 2007. — № 1 (2). — 2007. — С. 82-90.

3. Рак легкого: перевод с англ. / под ред. П. Лоригана; ред. серии А. Т. Скарин. — М. : ООО «РадЭлсивер», 2009 — 196 с.

4. Семенова А. И. Гиперкальциемия и синдром распада опухоли / А. И. Семенова // Практическая онкология, — 2006. — N 7 (2). — С. 101-104.

5. Chu P. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases / P. Chu, E. Wu, L. M. Weiss // Mod. Pathol. — 2000. — № 13 (9). — P. 962-971.

6. Influence of apoptosis and cycle regulator proteins on chemotherapy response and survival in IIIA/IIIB non-small cell lung cancer patient II / C. Martin, J. Morero, C. Polery [et al.] // IIth World Conference on Lung Cancer: abstracts. — Barcelona, Spain, 2005. — P. 285.

7. New insights on cell death from radiation exposure. / K. M. Prise, G. Schettino, M. Folkard [et al.] // Lancet Oncology. — 2005. — N 6. — P. 520-528.

8. Overview of cancer molecular radiobiology. / J. N. Sankaria, R. G. Branstow, S. M. Bentzen, [et al.] // Radiation Oncology Advances. — New York : Springer, 2008. — P. 117-133.



УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛІТИН
НЕДРІБНОКЛІТИННОГО
РАКУ ЛЕГЕНІ ХВОРИХ ПІСЛЯ
ХІМІОРАДІОМОДИФІКАЦІЇ
ТАКСОТЕРОМ

В. П. Старенький

Резюме. Вивчено ультраструктурні зміни органел пухлинних клітин хворих з недрібноклітинним раком легені після традиційної променевої терапії. Показано, що в популяції клітин була присутня велика кількість метаболічно активних клітин. Проведення хемопроменевої терапії із застосуванням таксотера призводить до глибших деструктивних порушень субмікроскопічної архітекtonіки пухлинних клітин. Передопераційне опромінення таксотером супроводжується вираженими характеристиками променевого патоморфоза і призводить до необоротного ураження ультраструктур клітин різних гістологічних форм раку легенів.

Ключові слова: *рак легені, ультраструктура пухлинних клітин, хіміопроменева терапія, таксотер.*

ULTRASTRUCTURE OF THE
CELLS OF THE NON-SMALL
CELLS LUNG CANCER OF
THE PATIENTS AFTER THE
CHEMORADIOMODIFICATION
USING THE TAXOTERE

V. P. Starenkiy

Summary. The ultrastructural changes of the organelles in the tumour cells of the patients having the non-small cells lung cancer after the traditional radiation therapy have been studied. It is shown that the large number of metabolically active cells were available in the cell pool. The chemoradiotherapy using the taxotere leads to more profound destructive abnormalities of the submicroscopic architectonics in the tumour cells. The preoperative radiation with the taxotere is accompanied by significant characteristics of the radiation pathomorphism and leads to the irreversible damage of the cell ultrastructures of different histological grades of the lung cancer.

Key words: *lung cancer, ultrastructure of tumour cells, chemoradiotherapy, taxotere.*