



В. П. Старенький

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

© Старенький В. П.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ НАРУШЕНИЯ ОРГАНЕЛЛ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА У КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОБЛУЧЕНИЯ И ХИМИОТЕРАПИИ

Резюме. Проведенным электронно-микроскопическим исследованием в эксперименте на крысах опухоленосителях показано, что клетки аденокарциномы Герена чувствительны к действию Цисплатина и через 24 часа после его введения наступают повреждения ядерного аппарата опухолевых клеток и вступления клеток на путь апоптоза. Цисплатин не увеличивает радиочувствительность опухолевых клеток. Использование Таксотера дозой 8 мг/кг через сутки практически не оказывает влияния на ультраструктуру клеток карциномы Герена, однако лучевая терапия на фоне его введения приводит к гибели подавляющего большинства опухолевых клеток. Введение Этопозидом дозой 5 мг/кг массы тела приводит к торможению процессов митотического деления клеток, а совместное применение Этопозидом и лучевой терапии усиливало действие каждого из них.

Ключевые слова: аденокарцинома Герена, ультраструктура опухолевых клеток, лучевая терапия, Цисплатин, Таксотер, Этопозид.

Введение

Перспективным направлением повышения эффективности лучевой терапии злокачественных новообразований, многие авторы считают применение различных способов радиомодификации и, в частности, хемосенсибилизацию [7].

Данные литературы последних лет и ранее выполненные собственные исследования свидетельствуют о значительном радиосенсибилизирующем действии таких химиотерапевтических агентов, как Таксаны, Этопозид, Цисплатин, эффективность которых наблюдалась и при использовании в субтерапевтических дозах [3-6]. Способ хемосенсибилизации привлекает своей простотой, а также тем, что при использовании цитостатиков в различных режимах можно контролировать выраженность токсических эффектов. Вместе с тем, часть вопросов, связанных с развитием этого перспективного направления, требуют дальнейшей научной проработки. Прежде всего, это касается проблемы оптимального соотношения дозы химиопрепарата, режима фракционирования облучения и, особенно, определения объективных критериев эффективности терапевтического воздействия. По мнению ряда авторов гистоморфологическое исследование, в том числе и электронная микроскопия, позволяют дать наиболее полную характеристику ответа опухоли на терапевтическое воздействие [1, 2].

Цель исследования

Оценить ультраструктурные нарушения органелл клеток аденокарциномы Герена у крыс при воздействии облучения и химиотерапии.

Материалы и методы исследований

В эксперименте на крысах опухоленосителях проводились электронно-микроскопические исследования клеток аденокарциномы Герена, интактной опухоли, облученной и подверженной воздействию Цисплатина, Таксотера, Этопозидом, а также при их сочетании с лучевой терапией.

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 в 1 % забуференный раствор четырехоксида 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 УМП-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

Электронно-микроскопическое исследование препаратов интактной карциномы Герена



выявило, что опухолевые клетки располагаются полями, вокруг которых находятся участки некроза. Клетки аденокарциномы Герена разделены электронно прозрачными промежутками и соединяются только в отдельных местах простыми контактами или десмосомами. В некоторых случаях они тесно прилегают одна к другой. Свободная поверхность часто образует цитоплазматические ворсинки. Ядра опухолевых клеток округлые, иногда имеют извилистый контур, содержат глыбки конденсированного хроматина и большие четкие ядрышки. В электронно плотной цитоплазме расположены многочисленные свободные рибосомы и полисомы, небольшие округлые цистерны гранулярной эндоплазматической сети, заполненные темной аморфной субстанцией, мелкие митохондрии и лизосомы. В некоторых клетках обнаруживались как единичные липидные капли, так и в виде скоплений липидных включений (рис. 1а).

Встречаются митотически делящиеся клетки. Очень редко обнаруживаются клетки, находящиеся в состоянии апоптоза, на что указывают характерного вида ядра (рис. 1б). Хроматин в них большей частью конденсирован

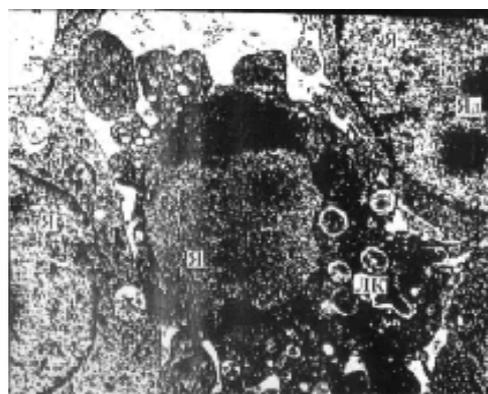
и представляет собой плотные темные массы, расположенные на периферии ядра. Центральная часть ядерного матрикса потеряла электронную плотность. Зачастую наблюдалась фрагментация цитоплазмы.

Через 1 сутки, после фракционного облучения опухоли суммарной дозой 10 Гр в препаратах определяются скопления жизнеспособных клеток, ультраструктура которых остается такой же, как и в интактной опухоли. Ультраструктурная организация опухолевых клеток была подвержена различным изменениям. Одни клетки имеют ядра причудливой формы, ядерная мембрана образует глубокие инвагинации. В некоторых ядрах хроматин собирается темными глыбками, ассоциированными с нуклеолеммой (рис. 2а), что может быть одним из первых признаков апоптоза. Встречаются опухолевые клетки, подверженные некрозу (рис. 2б).

В цитоплазме отдельных клеток содержится много расширенных цистерн гранулярной эндоплазматической сети, в других – фагосомы разного размера и структуры. Появляются темные, функционально неактивные клетки. В непосредственной близости от опухолевых



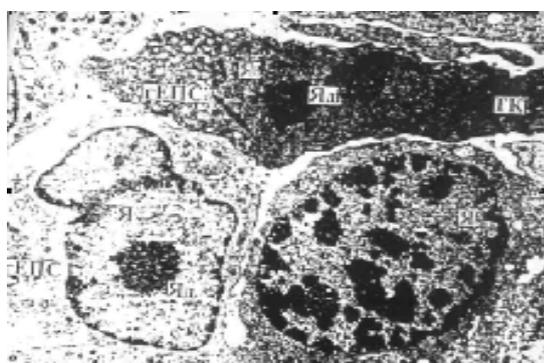
а



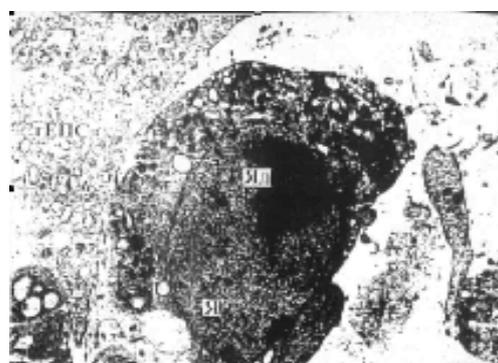
б

Рис. 1. Ультраструктура клеток интактной карциномы Герена, × 8000:

а – соединение клеток простым контактом и десмосомами; б – опухолевые клетки в состоянии апоптоза



а



б

Рис. 2. Ультраструктура клеток карциномы Герена через сутки после фракционного облучения суммарной дозой 10 Гр, × 8000: а – темная, функционально неактивная клетка с глыбчатым хроматином, клетка с ядром уродливой формы; б – некротическая опухоль с апоптическим ядром

клеток часто находятся сегментоядерные лейкоциты, что может свидетельствовать о процессах воспаления.

Исследование ультраструктуры клеток карциномы Герена через 24 ч после введения Цисплатина в дозе 6 мг/кг показало, что ее клетки располагаются достаточно большими полями и изредка соседствуют с участками некроза. Но в популяции опухолевых клеток резко снижается количество нормальных форм. На фоне высокой митотической активности появляются патологические митозы (рис. 3а), ядра уродливой формы (рис. 3б). Фрагментированные ядра, как и двуядерные клетки, встречаются достаточно часто.

Увеличивается количество клеток, находящихся в состоянии апоптоза (рис. 3в). Значительно активизируется и фагоцитоз в опухолевых клетках. В препаратах встречаются группы клеток, цитоплазма которых содержала многочисленные электронно прозрачные вакуоли (рис. 3г). Все это указывает на высокую противоопухолевую эффективность Цисплатина.

Облучение крыс через 24 часа после введения Цисплатина, клетки карциномы располагались полями, окруженными участками некроза. Их ультраструктура не отличается от интактной нормы.

Как и при действии только облучения, в отдельных клетках, наблюдаются ядра с глубокими инвагинациями ядерной мембраны и расширенными цистернами гранулярной эндоплазматической сети. В единичных случаях в цитоплазме присутствовали вакуоли, фагосомы и липидные капли. Митотическая активность находится на границах колебания нормы и недостоверно отличается от этого показателя в серии с одним облучением. Но процессы апоптоза при этих условиях выражены достаточно заметно. В препаратах присутствовали клетки с фрагментированными ядрами, что характерно для апоптоза.

Через 1 сутки после введения Таксотера дозой 8 мг/кг в карциноме Герена наблюдаются большие поля опухолевых клеток и участки некроза. Большинство опухолевых клеток представлена формами, ультраструктура которых соответствует интактным клеткам. Только в небольшом количестве опухолевых клеток находятся расширенные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикула (рис. 4а), заполненные мелко гранулярной субстанцией. Пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи гипертрофирован, что может указывать на дифференциацию этих клеток с усилением белково-синтетической активно-

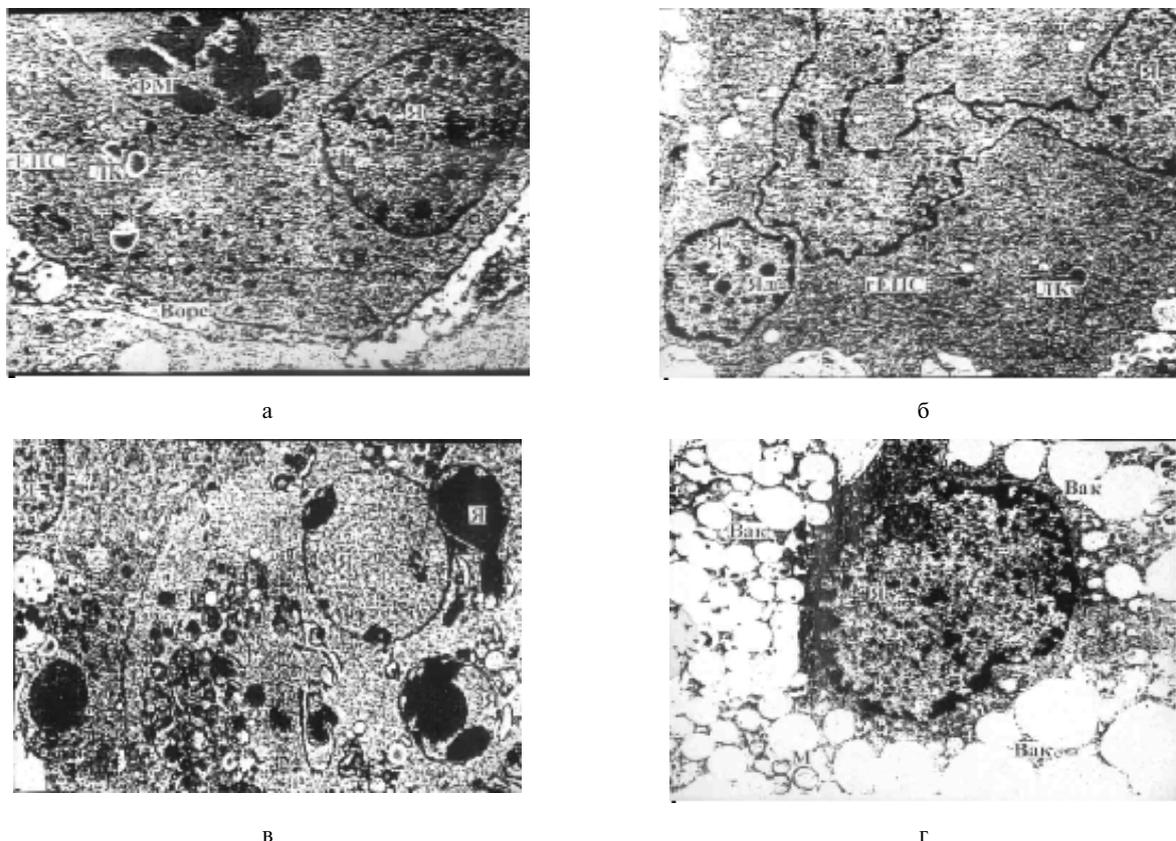


Рис. 3. Ультраструктура клеток карциномы Герена через 24 часа после введения Цисплатина в дозе 6 мг/кг, $\times 8000$: а – патологический митоз в ОК; б – ядро уродливой формы; в – апоптоз в ОК с фрагментированным ядром; г – вакуолизация цитоплазмы



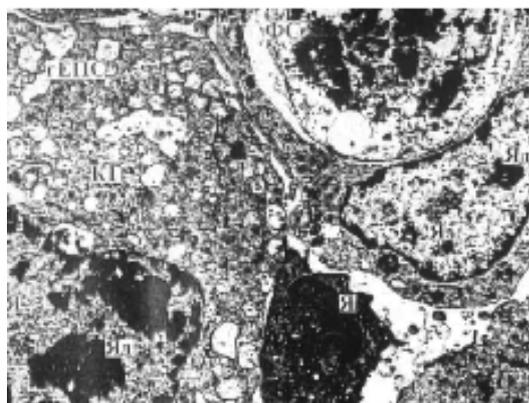
сти. Иногда в цитоплазме опухолевых клеток локализовались вторичные лизосомы. Ядра отдельных клеток приобретают причудливый вид (рис. 4б) и фрагментируются. Изредка в препаратах обнаруживаются двуядерные клетки. Небольшое количество опухолевых клеток находятся в состоянии апоптоза. Характерным является достоверное снижение количества клеток в состоянии митоза.

В серии экспериментов, где облучение опухоли Герена проводили через 1 сутки после введения Таксотера, было установлено, что совместное действие этих факторов вызывает гибель большинства клеток карциномы. Основной объем опухоли занимает некротизированная ткань, а жизнеспособные клетки располагаются небольшими скоплениями только вокруг сосудов.

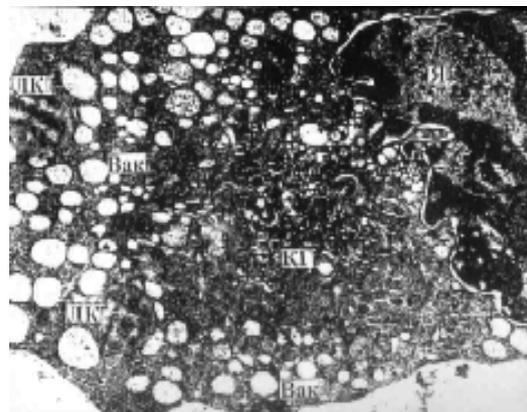
Их митотическая активность резко и достоверно снижена, как по сравнению с этими показателями в группе интактного контроля, так и в группе только облученных опухолей. Наряду с этим в препаратах обнаруживают-

ся опухолевые клетки с ультраструктурными перестройками подобными тем, которые наблюдались при действии только облучения без введения Таксотера. В них изменялись форма ядра, в цитоплазме определялись отдельные вакуоли, липидные включения, расширенные цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума.

Под воздействием Этопозида в дозе 5,0 мг/кг наблюдается выраженный полиморфизм опухолевых клеток. В препаратах преобладают клетки нормального вида, а также те, в которых заметно расширены цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума по структуре сходные с опухолевыми клетками, подверженными воздействию облучения. Определяются формы с длинными вытянутыми, округлыми и угловатыми цистернами гранулярной эндоплазматической сети. У многих клеток гипертрофирован пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи. Обращает внимание также наличие клеток с уродливым ядром и большим количеством очень

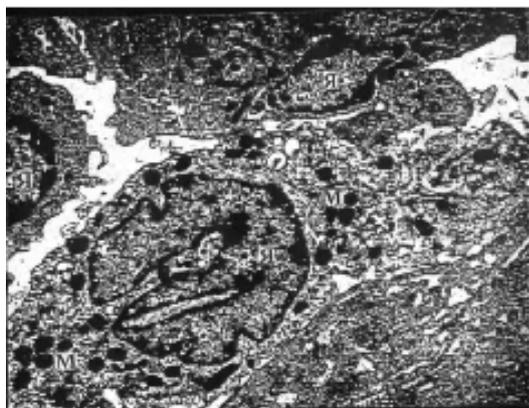


а

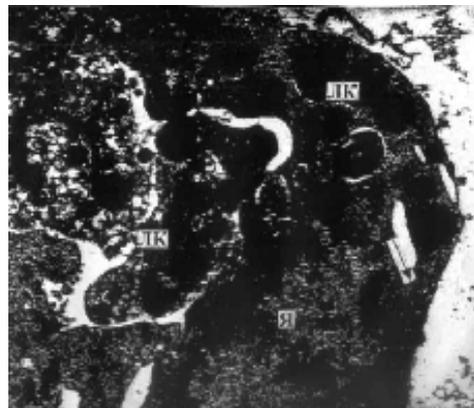


б

Рис. 4. Ультраструктура клеток карциномы Герена через 24 часа после введения Таксотера дозой 8 мг/кг, $\times 8000$. а — расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети, гипертрофия пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи, фагосома в цитоплазме; б — ядра причудливой формы, вакуоли в цитоплазме, гипертрофия пластинчатого цитоплазматического комплекса Гольджи



а



б

Рис. 5. Ультраструктура клеток карциномы Герена через 24 часа после введения Этопозида в дозе 5,0 мг/кг, $\times 8000$: а — темные митохондрии в цитоплазме; б — включения липидов

темных митохондрий (рис. 5а). Достаточно часто в цитоплазме выявлялись первичные и вторичные небольшого размера лизосомы как плотной, так и рыхлой консистенции. Единичные клетки содержали скопления больших липидных тел в цитоплазме (рис. 5б), что может свидетельствовать об их гибели. Введение препарата влияло также и на процессы деления. В препаратах присутствовали отдельные двуядерные клетки. Уменьшалось количество митозов.

Наиболее распространенными формами клеток в опухоли Герена после введения Этопозиды с последующим облучением являются клетки, которые имеют расширенные цистерны гранулярной эндоплазматической сети разной формы. Содержание цистерн варьировало по плотности от темных до электронно пустых.

В этой серии экспериментальных животных в ткани опухоли обнаруживается значительное количество темных функционально неактивных клеток. Часть клеток имела ядра уродливой формы, в матриксе которых располагалось крупное плотное ядрышко, а в электронно плотной цитоплазме определяются мелкие митохондрии с очагами деструкции крист, редуцированный пластинчатый цитоплазматический комплекс Гольджи, лизосомы и липидные капли. В других — ядро и цитоплазма настолько темные, что на их фоне органеллы выглядят как вакуоли и невозможно было установить их происхождение.

Но наиболее характерными при совместном действии Этопозиды и облучения являются выраженные процессы фагоцитоза. В одних клетках можно найти первичные и вторичные лизосомы и остаточные тельца (рис. 6а), в других — огромные фагосомы, которые иногда заполняют почти всю цитоплазму, оттесняя ядро на периферию (рис. 6б). Следует отметить угнетение митотической активности под воздействием обоих факторов.

Проведенное исследование показало, что фракционированное рентгеновское облуче-

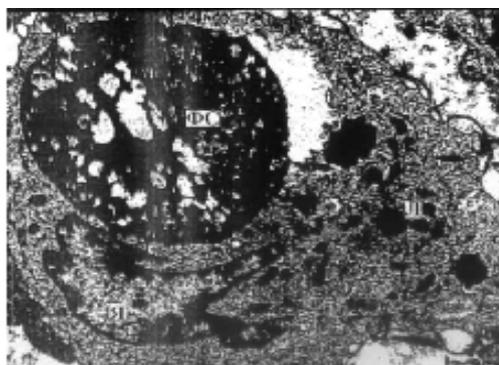
ние суммарной дозой 10 Гр мало изменяет структурно-функциональное состояние клеток карциномы Герена. Вместе с тем эта опухоль является значительно чувствительной к действию Цисплатина, введение которого уже через 24 ч приводит к выраженным повреждениям ядерного аппарата опухолевых клеток и росту апоптической гибели. Однако, следующее облучение после введения Цисплатина полностью нивелирует его действие и ультраструктура большинства клеток почти не отличается от той, которая наблюдается при действии только радиационного фактора, за исключением активации процессов апоптоза.

Можно допустить, что в этом феномене определенную роль играют свойства Цисплатина. Этот препарат не блокирует митотическую активность и даже ее увеличивает, не приводя к радиосенсибилизации клеток карциномы Герена, которые являются достаточно стойкими к облучению, стимулирует апоптоз и, очевидно, действует кратковременно. В связи с этим можно представить такой сценарий развития событий. Введение Цисплатина приводит к повреждениям в опухоли Герена и активизирует процессы деления. В отсутствие дополнительных доз препарата на протяжении 3-х суток, которые проходят от момента инъекции до забоя животных, ткань карциномы освобождается от необратимо пораженных клеток путем апоптоза, а достаточно высокая митотическая деятельность компенсирует их потерю. Поскольку Цисплатин не усиливает радиочувствительность опухоли, действие облучения вызывает те же самые изменения, что и в отсутствие препарата.

При использовании Таксотера дозой 8 мг/кг через 1 сутки отмечаются незначительные изменения ультраструктуры карциномы Герена на фоне вероятного падения митотической активности, тогда как совместное действие этого препарата и облучения приводило к гибели подавляющего большинства опухолевых клеток.



а



б

Рис. 6. Ультраструктура клеток карциномы Герена через 24 часа после введения химиопрепарата и облучения, $\times 8000$: а — вторичные лизосомы и остаточные тельца; б — гигантская фагосома, оттесняющая ядро



В этом случае, очевидно, Таксотер не только тормозит процессы деления, но и длительно сенсibiliзирует клетки карциномы к действию радиации, что приводит к их гибели при следующих курсах облучения, а низкий уровень митотической активности не дает возможности нормального течения процессов обновления.

Однократное введение Этопозиды дозой 5 мг/кг массы тела также приводило к процессам дифференциации и торможения деления клеток в опухолевой ткани. Совместное применение Этопозиды и лучевой терапии усиливало действие каждого из них в отдельности. При этом не только возрастает белково-синтетическая деятельность опухолевых клеток, которую вызывает оба фактора, и появляются функционально неактивные клетки, что характерно для действия облучения, но и значительно стимулируются процессы фагоцитоза, а уровень митотической активности снижается относительно аналогичных показателей в интактной опухоли.

Выводы

1. Фракционированное рентгеновское облучение суммарной дозой 10 Гр мало изменяет ультраструктурную организацию клеток карциномы Герена.

2. Опухолевые клетки карциномы Герена чувствительны к действию Цисплатина, введение которого уже через 24 ч приводит к выраженным повреждениям ядерного аппарата и появлению клеток вступивших на путь апоптоза.

3. Введение Цисплатина не влияет на последующее облучение и ультраструктура большинства клеток почти не отличается от той, которая наблюдается при действии только радиационного фактора.

4. Введение Таксотера дозой 8 мг/кг через сутки практически не изменяет субмикроскопическое строение клеток карциномы Герена, тогда как последующее облучение приводит к гибели подавляющее количество опухолевых клеток.

5. Однократное введение Этопозиды дозой 5 мг/кг массы тела замедляет процесс деления клеток в опухолевой ткани. Совместное применение Этопозиды и лучевой терапии усиливало действие каждого из них в отдельности.

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. 138-148.

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

3. Радіосенсибілізуюча дія таксолу на карциному Герена *in vivo* / В. А. Барабой, В. А. Зінченко, І. О. Коленова, В. П. Старенький // Укр. радіологічний журнал. — 1999. — № 7 — С. 396-399.

4. Старенький В. П., Влияние субтерапевтических доз доцетаксела (Таксотера) на эффективность радиотерапии и прооксидантно-антиоксидантный баланс у крыс с карциномой Герена / В. П. Старенький, Л. Я. Васи-

льев, Ю. В. Никитченко // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2003. — Том 43, № 4. — С. 443-449.

5. Effect of docetaxel on the therapeutic ratio of fractionated radiotherapy *in vivo*. / K. A. Masson, K. Kishi, N. Hunter [et al.] // Clin. Cancer Res. — 1999. — Vol. 5, № 12. — P. 4191-4198.

6. Phase II randomised trial comparing docetaxel given every 3 weeks with weekly schedule as second-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSLC) / R. Gervais, A. Ducolone, J. L. Breton [et al.] // Ann. Oncology. — 2005. — Vol. 16, № 1 — P. 90-95.

7. Study of paclitaxel, etoposide and cisplatin chemotherapy combined with twice-daily thoracic radiotherapy for patient with limited-stage small-cell lung cancer; a Radiation Therapy Oncology Group 9609 Phase II Study. / D. S. Ettinger, B. D. Berkey, R. A. Abrams [et al.] // J. Clin. Oncology 2005. — Vol. 23, № 22. — С. 4991-4998.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЕ
ПОРУШЕННЯ
ОРГАНЕЛІ КЛІТИН
АДЕНОКАРЦИНОМИ
ГЕРЕНА У ЩУРІВ ПРИ
ВПЛИВІ ОПРОМІНЕННЯ
ТА ХІМІОТЕРАПІЇ

V. P. Starenkiy

Резюме. Проведеним електронно-мікроскопічним дослідженням в експерименті на щурах носіях пухлини показано, що клітки аденокарциноми Герена чутливі до дії Цисплатину і через 24 години після його введення настають пошкодження ядерного апарату пухлинних клітин і вступу клітин на шлях апоптозу. Цисплатин не збільшує радіочутливість пухлинних клітин. Використання Таксотера дозою 8 мг/кг через добу практично не впливає на ультраструктуру клітин карциноми Герена, проте променева терапія на тлі його введення призводить до загибелі переважної більшості пухлинних клітин. Введення Етопозіда дозою 5 мг/кг маси тіла призводить до гальмування процесів мітотичного ділення клітин, а спільне вживання Етопозіда і променевої терапії підсилювало дію кожного з них.

Ключові слова: аденокарцинома Герена, ультраструктура пухлинних клітин, променева терапія, Цисплатин, Таксотер, Етопозід.

ULTRASTRUCTURAL
ABNORMALITIES IN THE
ORGANELLES OF THE RAT
HEREN ADENOCARCINOMA
CELLS UNDER INFLUENCE
OF RADIATION EXPOSURE
AND CHEMOTHERAPY

V. P. Starenkiy

Summary. By the electronic-microscopic investigation during the experiment with tumor-bearing rats, it is shown that the Heren adenocarcinoma cells are sensitive to the effect of the cisplatin, and 24 hours after injection the damages of the atom apparatus of the tumor cells take place and the cells take the apoptosis path. The cisplatin does not increase radiosensitivity of the tumour cells. Application of the taxotere with a 8 mg/kg dose in 24 hours practically produce no influence on the ultrastructure of the Heren carcinoma cells, however, the radiation therapy on the background of its injection leads to death of the majority of the tumour cells. Injection of the etoposide with a 5 mg/kg dose of the body mass leads to suppression of the indirect cell division processes, and joint application of the etoposide and the radiation therapy enhanced activity of any of them.

Key words: Heren adenocarcinoma, ultrastructure of tumour cells, radiation therapy, cisplatin, taxotere, etoposide.