

Е.В.Григорьева

Государственное учреждение "Институт фармакологии и токсикологии" АМН Украины (Киев)

Ключевые слова:
фторпиримидины, гистология, апоптоз, некроз, митоз.

Надійшла: 18.10.2009
Прийнята: 22.11.2009

УДК 615.2+616.006+547.854

ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЬТЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

Резюме. Целью данной работы являлось изучение процессов альтерации ткани экспериментальных опухолей при воздействии нового антинеопластического вещества в сравнении с известным 5-фторурацилом. Материалом для исследования послужила ткань саркомы 45, саркомы 180, лимфосаркомы Плисса, карциносаркомы Уокера, перевитая белым беспородным крысам после курсового введения 5-фторурацила и соединения ФП-8. Кусочки исследуемых опухолей фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и жидкости Карнуа, по стандартизированной методике обезживали в этаноле возрастающей концентрации и заключали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по методу van Gieson, Mc Manus, по методу Фельгена и Picro-Mallori. Иммуногистохимическими методами в ткани опухоли выявляли маркеры апоптоза p-53 и bcl-2. Производили оценку апоптотического и митотического индексов, относительного объема зон некроза ткани. Показан односторонний характер и степень выраженности структурных изменений экспериментальных опухолей, значительное угнетение процесса роста ткани опухоли, усиление альтеративных изменений, нарушение гемодинамики в ткани опухоли с ее склерозированием при введении как ФП-8, так и 5-фторурацила.

Морфология. – 2009. – Т. III, № 4. – С. 14-18.
© Е.В.Григорьева, 2009

Grygorieva E.V. Investigation of tumor tissue alteration after experimental chemotherapy.

Summary. The aim of the present work was the study of tumor tissue alteration after new antineoplastic substance administration in comparison with widely investigated 5-fluorouracil. White rats bearing Plisse lymphosarcoma, sarcoma 45, Walker carcinosarcoma, sarcoma 180 were used in the study. Pieces of tumor tissue were fixed in 10% neutral formaldehyde and processed using standard procedure. Histological slides were stained by hematoxylin and eosin method, van Gieson, Mc Manus, Feulgen and Picro-Mallori methods. Apoptotic markers p-53 and bcl-2 were detected using immunohistological method. Apoptotic index, mitotic index, comparative area of necrotic tissue estimation have been carried out. The unidirectional changes of experimental tumor tissue, the significant tumor growth inhibition, alteration, scar tissue formation, blood circulation disturbances due to FP-8 and 5-fluorouracil administration were shown.

Key words: fluoropyrimidines, histology, apoptosis, necrosis, mitosis.

Введение

Темпы возрастания заболеваемости новообразованиями различных локализаций требуют постоянной разработки новых высокоэффективных противоопухолевых препаратов. Достижения молекулярной биологии, биохимии, онкофармакологии позволяют найти новые мишени для воздействия противоопухолевых препаратов. Вопреки существованию множества соединений с различными механизмами действия эта проблема остается нерешенной до настоящего времени.

Одним из признанных методов оценки цитостатического эффекта препаратов является морфологическая верификация.

Как известно, в процессе опухолевого роста имеет большое значение баланс между пролифе-

рацией и гибелью клеток путем апоптоза или некроза. Значительное число работ посвящено изучению роли апоптоза – запрограммированной смерти клетки – и факторов, приводящих к его активации в процессах угнетения роста опухолевой ткани при воздействии химиотерапии и лучевой терапии. Апоптоз – механизм гибели клеток, имеющий ряд биохимических и морфологических отличий от некроза, представляет собой процесс, посредством которого внутренние или внешние сигналы, активируя генетическую программу, приводят к гибели клетки (Hagiwara S. et al., 2007; Liu H.C. et al., 2008; Banerjee S. et al., 2009; Cao L.Q. et al., 2009; Thoennissen N.H. et al., 2009).

Целью работы являлось изучение процессов альтерации ткани экспериментальных опухолей

при воздействии нового антинеопластического вещества в сравнении с известным 5-фторурацилом.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужила ткань саркомы 45, саркомы 180, лимфосаркомы Плисса, карциносаркомы Уокера перевитая белым беспородным крысам массой 100-120 г, после курсового введения 5-фторурацила и синтезированного в Институте фармакологии и токсикологии потенциального противоопухолевого средства, соединения фторпиримидина-8 (ФП-8), изучаемого в качестве транспортной формы 5-фторурацила. Для микроскопического изучения кусочки исследуемых опухолей фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и жидкости Карнуа, по стандартизованной методике обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и заключали в парафин. Гистологические срезы толщиной 3-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по методу van Gieson. Гликозаминогликаны выявляли окрашиванием по методу Mc Manus, нуклеиновые кислоты – по методу Фельгена, фибрин – по методу Picro-Mallori (Луппа Х., 1980). Иммуногистохимическими методами в ткани опухоли выявляли маркеры апоптоза p-53 и bcl-2. Препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа Olimpus BX51 с компьютером, снабженным программой для морфометрических исследований. Оценка процессов роста экспериментальных новообразований произведена посредством подсчета митотического индекса (Сао S. et al., 1999). Процессы альтерации ткани опухоли оценивали по апоптотическому индексу и относительному объему зон некроза ткани (Scherop A.M. et al., 1996).

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенных морфологических исследований свидетельствуют о выраженном влиянии фосфорилированных урацилов на структуру экспериментальных опухолей. Введение животным-опухоленосителям 5-фторурацила и ФП-8 приводит к торможению пролиферации опухолевых клеток, значительным альтеративным изменениям опухолей преимущественно апоптотического характера (рис. 1). Наблюдается усиление воспалительной инфильтрации демаркационной зоны и очагов некроза с последующим склерозированием ткани. Степень выраженности обозначенных изменений различна на разных моделях в зависимости от вида опухоли и вводимого препарата.

При гистологическом исследовании установлено, что введение 5-фторурацила и ФП-8 животным-опухоленосителям приводит к распространению альтеративных изменений ткани опухоли с углублением их и превалированием явлений необратимого повреждения опухолевой паренхимы. Так, к проявлениям гибели перифе-

рических участков клеток периваскулярных опухолевых муфт присоединяется распространение зон некроза, вследствие чего формируется характерная картина отдельных островков опухолевой паренхимы, окруженных тканевым детритом (Heidelberger C., Griesbach L., 1958). Следует отметить, что также распространяются проявления дистрофии клеток опухоли. Сохраненная опухолевая паренхима выглядит более мономорфной, чем у контрольных животных (рис. 2, 3).

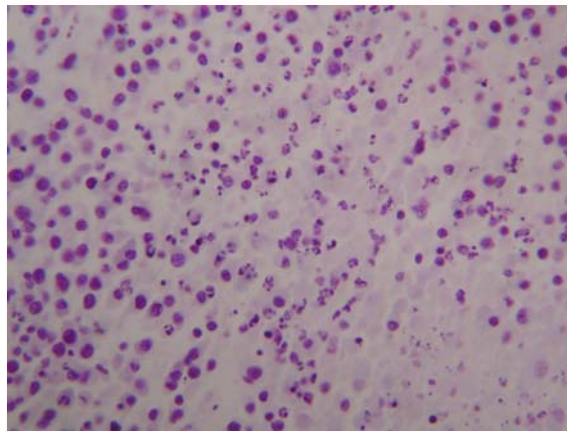


Рис. 1 Формирование апоптотических телец в ткани саркомы 45 при четырехкратном введении соединения ФП-8 в дозе 100 мг/кг каждые 72 часа. Окраска гематоксилином-эозином. $\times 200$.

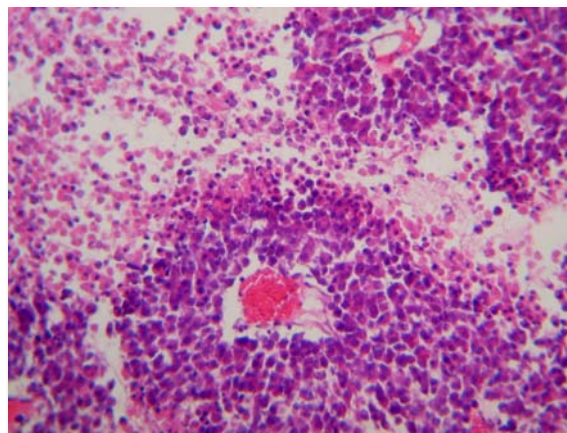


Рис. 2. Образование островков опухолевой паренхимы окруженных тканевым детритом при четырехкратном введении соединения ФП-8 в дозе 100 мг/кг каждые 72 часа животным – носителям саркомы 45. Окраска гематоксилином-эозином. $\times 100$.

Гемоциркуляторные нарушения в исследуемых опухолях при наличии большого количества сосудов синусоидного типа приобретают диссеминированный характер с множественными тромбами, преимущественно в зонах повреждения опухолевой паренхимы в просвете коллабируемых сосудов (Юшков С.Ф., Розенберг И.Б.,

1971). В то же время, синусоиды в центрах островков опухолевой ткани полнокровные или опустошенные, без признаков тромбообразования.

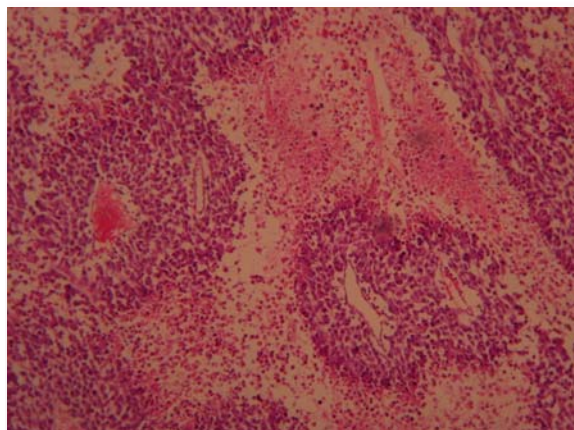


Рис. 3. Образование островков опухолевой паренхимы окруженных тканевым детритом при четырехкратном введении 5-фторурацила в дозе 31,3 мг/кг каждые 72 часа животным – носителям саркомы 45. Окраска гематоксилином-эозином. $\times 100$.

Выявленные альтеративные изменения сопровождается усиление воспалительной инфильтрации

как демаркационной зоны, так и очагов некроза. Лишь в отдельных случаях наблюдается выраженная воспалительная инфильтрация тканевого детрита. В периферической зоне опухоли отмечается разрастание молодой соединительной ткани. В части наблюдений имело место склерозирование ткани новообразований с сохранением отдельных комплексов опухолевых клеток между пластинами зрелой соединительной ткани.

Количественная оценка влияния вещества ФП-8 и 5-фторурацила на процессы роста ткани опухоли продемонстрировала достоверное снижение митотического индекса в ткани саркомы 180, лимфосаркомы Плисса, карциносаркомы Уокера. Имела место тенденция снижения количества патологических митозов. В большинстве опухолевых клеток, которые находились в процессе деления, хромосомы фрагментированы, расположены беспорядочно. Отмеченные повреждения хромосомного аппарата и системы веретена, очевидно, приводили к потере клетками способности к дальнейшему делению, которое было причиной снижения митотического индекса. В то же время, введение животным ФП-8 и 5-фторурацила на модели саркомы 45 не продемонстрировало достоверного снижения митотического индекса (табл. 1).

Таблица 1

Влияние вещества ФП-8 на митотический индекс экспериментальных опухолей

Экспериментальные опухоли	Митотический индекс, % ($M \pm m$)					
	5-фторурацил		ФП-8		Контроль	
	Для общего количества митозов	Для патологических митозов	Для общего количества митозов	Для патологических митозов	Для общего количества митозов	Для патологических митозов
Лимфосаркома Плисса	0,20 \pm 0,04*	0,10 \pm 0,03*	0,60 \pm 0,13*	0,20 \pm 0,02*	1,70 \pm 0,20	1,20 \pm 0,20
Саркома 45	0,50 \pm 0,12	0,20 \pm 0,04	0,40 \pm 0,06	0,30 \pm 0,05	0,50 \pm 0,09	0,20 \pm 0,06
Карциносаркома Уокера	0,20 \pm 0,03*	0,10 \pm 0,04	0,10 \pm 0,03*	0,06 \pm 0,02	0,50 \pm 0,13	0,10 \pm 0,05
Саркома 180	1,02 \pm 0,18*	0,47 \pm 0,13	0,96 \pm 0,20*	0,63 \pm 0,14	2,40 \pm 0,15	0,72 \pm 0,06

Примечание: * – достоверно по отношению к контролю.

В тканях исследованных опухолей выявлен достоверный рост апоптотического индекса, который был подтвержден данными иммуногистохимического определения маркеров апоптоза. У животных контрольной группы спонтанный апоптоз клеток отмечался в небольшом количестве в жизнеспособной ткани и в характерной области на границе некротизированной и жизнеспособной ткани. При воздействии соединения ФП-8 и 5-фторурацила апоптотически измененные клетки преимущественно локализовались вне зон некроза, их количество по отношению к

контрольной группе увеличивалось (табл. 2).

Введение соединения ФП-8 и 5-фторурацила не приводило к достоверным изменениям относительного объема зон некроза в ткани всех экспериментальных опухолей кроме саркомы 180, где имело место достоверное по сравнению с контролем увеличение относительных зон некроза после введения ФП-8 (табл. 3).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о противоопухолевой эффективности соединения ФП-8. Отсутствие достоверных изменений параметра относительных зон

некроза после применения химиотерапии на большинстве экспериментальных штаммов может быть следствием угнетения опухолевого роста под влиянием исследованных цитостатиков (снижение митотического индекса, макро-

скопических параметров экспериментальных опухолей) и меньшей выраженности, связанной с этим, недостаточности васкуляризации опухолевой ткани.

Таблица 2
Влияние вещества ФП-8 на апоптотический индекс ткани экспериментальных опухолей

Экспериментальные опухоли	Апоптотический индекс, % (M±m)		
	5-фторурацил	ФП-8	Контроль
Лимфосаркома Плиса	7,40±2,40*	6,00±0,50*	1,10±0,30
Саркома 45	6,90±2,10	6,95±3,35	3,52±1,66
Карциносаркома Уокера	4,00±0,50*	5,30±0,75*	0,90±0,06
Саркома 180	2,00±0,39*	2,00±0,33*	0,30±0,12

Примечание: * – достоверно по отношению к контролю.

Таблица 3
Влияние вещества ФП-8 на показатель относительной площади зон некроза в ткани экспериментальных опухолей

Экспериментальные опухоли	Относительная площадь зон некроза, % (M±m)		
	5 – фторурацил	ФП – 8	Контроль
Лимфосаркома Плиса	12,40±9,53	11,20±2,77	6,77±1,27
Саркома 45	77,30±8,67	85,30±7,52	81,20±7,25
Карциносаркома Уокера	76,80±8,40	57,00±8,25	76,3±7,5
Саркома 180	6,20±1,70	22,60±3,29*	9,00±1,45

Примечание: * – достоверно по отношению к контролю.

Заключение

Количественными морфологическими исследованиями подтверждена противоопухолевая эффективность соединения ФП-8 (достоверное снижение митотического индекса, увеличение апоптотического индекса).

Характер изменений в опухолевой ткани после введения вещества ФП-8 и 5-фторурацила однонаправленный.

Проведенные исследования свидетельствуют о значительной роли апоптоза в реализации противоопухолевой активности ФП-8.

Перспективой дальнейших исследований является комплексное изучение влияния данного вещества на органы и ткани лабораторных животных – носителей экспериментальных опухолей.

Литературные источники

Луппа Х. Основы гистохимии : [пер. с нем.] / Х. Луппа. – М. : Мир, 1980. – 334 с.

Юшков С. Ф. Влияние сарколизина и 5-фторурацила на рост перевиваемых опухолей и реакцию окружающей соединительной ткани / Юшков С. Ф., Розенберг И. Б // Фармакология и токсикология. – 1971. – № 6. – С. 718.

Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer / Banerjee S., Kaseb A. O., Wang Z. [et al.] // Cancer Res. – 2009. – Vol. 69, № 13. – P. 5575-5583.

Combination therapy with PEG-IFN-alpha and

5-FU inhibits HepG2 tumour cell growth in nude mice by apoptosis of p53 / Hagiwara S., Kudo M., Nakatani T. [et al.] // Br. J. Can. – 2007. – Vol. 97, № 11. – P. 1532-1537.

Counting of apoptotic cells: a methodological study in invasive breast cancer / H. Anna Maria van de Schepop, Johannes S. de Jong, Paul J. van Diest, Jan P. A. Baak // J. Clin. Pathol: Mol. Pathol. – 1996. – № 49. – P. 214 – 217.

Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells / Thoennissen N. H., Iwanski G. B., Doan N. B.

[et al.] // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, № 14. – P. 5876-5884.

Heidelberger C. Studies on fluorinated pyrimidines II. Effects on transplanted tumors / Heidelberger C., Griesbach L. // *Cancer Res.* – 1958. – Vol. 18. – P. 305-317.

Induction of cell cycle arrest and apoptosis by 5-fluorouracil in laryngeal cancer cells containing HPV16 E6 and E7 oncoproteins / Liu H. C., Chen G. G., Vlantis A. C. [et al.] // *Clin. Biochem.* – 2008. – Vol. 41, № 14-15. – P. 1117-1125.

Persistent induction of apoptosis and suppres-

sion of mitosis as the basis for curative therapy with S-1, an oral 5-fluorouracil prodrug in a colorectal tumor model / Shousong Cao, Kun Lu, Karoly Toth [et al.] // *Clin. Can. Res.* – 1999. – Vol. 5. – P. 267–274.

Rosiglitazone sensitizes hepatocellular carcinoma cell lines to 5-fluorouracil antitumor activity through activation of the PPARgamma signaling pathway / Cao L. Q., Wang X. L., Wang Q. [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2009. – Vol. 30, № 9. - P. 1316-1322.

Григор'єва К.В. Дослідження альтеративних процесів у тканині пухлин при експериментальній хіміотерапії.

Резюме. Метою даної роботи було вивчення процесів альтерації тканини експериментальних пухлин під впливом нової антинеобластичної сполуки в порівнянні з відомим 5-фторурацилом. Матеріалом для дослідження слугувала тканина саркоми 45, саркоми 180, лімфосаркоми Пліса, карциносаркоми Уокера, перещеплена білим безпородним щурам після курсового введення 5-фторурацилу та сполуки ФП-8. Шматочки досліджуваних пухлин фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну та рідині Карнуа, за стандартизованою методикою зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації та заключали в парафін. Гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином, за методом van Gieson, Mc Manus, за методом Фельгена та Рісго-Mallogi. Імуногістохімічними методами в тканині пухлини виявляли маркери апоптозу p-53 та bcl-2. Проводили підрахунок апоптотичного та мітотичного індексів, відносного об'єму зон некрозу тканини. Показано односпрямований характер та ступінь вираженості структурних змін експериментальних пухлин, значне пригнічення процесів росту тканини пухлини, посилення альтеративних змін, порушення гемоциркуляції в тканині пухлини з її склерозуванням при введенні як ФП-8, так і 5-фторурацилу.

Ключові слова: фторпіримідини, гістологія, апоптоз, некроз, мітоз.