

О.П. Лукашова

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

Дія іонізуючої радіації та препарату «Етопозид» на процеси апоптозу та ультраструктуру клітин карциноми Герена

The effect of ionizing radiation and etoposide on apoptosis and ultrastructure of Guerin's carcinoma cells

Цель работы: Электронномикроскопическое исследование отдельного и совместного действия облучения и химиопрепарата «Етопозид» на ультраструктуру клеток карциномы Герена и развитие апоптоза в ранние сроки.

Материалы и методы: С помощью стандартных методов электронной микроскопии изучена ультраструктура клеток карциномы Герена после локального рентгеновского облучения опухоли в дозе 5 Гр, введения химиопрепарата «Етопозид» в дозе 8 мг/кг, и облучения опухоли через 18 часов после введения препарата. Исследования проводили через 3, 6 и 24 ч. Контролем служили интактные опухоли.

Результаты: Установлено, что облучение опухоли через 3 ч приводит к появлению клеток в состоянии апоптотической гибели. Характерным для их ультраструктуры является ядро, хроматин в котором собирается темными массами вдоль ядерной мембраны, в то время как в кариоплазме выявляется гранулярная белковая субстанция, представленная, очевидно, ферментами нуклеинового обмена. Цитоплазма образует фестончатые выросты и апоптотные тельца, а ее органеллы имеют значительно нарушенную структуру. К 6 ч процессы апоптоза затихают, а на 1-е сутки опухолевые клетки (ОК) в этом состоянии отсутствуют. При действии этопозиды апоптотическая гибель ОК выражена слабо и уже через 6 ч не отмечается. Значительно больший эффект вызывает совместное применение химического и лучевого факторов. При этом индекс апоптоза достоверно возрастает во все сроки исследования с максимумом на 6 ч, причем наблюдаются разные этапы его развития: от тех ОК, в которых цитоплазма имеет почти нормальную структуру, до тех, где она фрагментируется или происходит гибель клеток. Процессы апоптоза начинают завершаться к 1-м суткам.

Установлено, что введение этопозиды тормозит процессы деления, особенно спустя сутки после введения, что согласуется с основным механизмом его действия. Снижение митотической активности наблюдается и во все сроки после химиолучевого воздействия.

Выводы: Радиация и этопозид, применяемые отдельно, являются слабыми индукторами апоптоза в карциноме Герена. Этопозид, введенный за 18 ч до облучения, создает условия для значительной стимуляции процессов апоптоза в ранние сроки после действия радиации с отчетливым максимумом на 6 ч. Этопозид тормозит митотическую активность клеток карциномы Герена, что проявляется через сутки как при отдельном применении, так и в комбинации с облучением и сопровождается ростом числа ОК небольшого размера. Характерным для действия радиации на ультраструктуру клеток карциномы Герена является наличие двух- и многоядерных клеток, а также клеток с микроядрами.

Ключевые слова: радиация, этопозид, опухоль Герена, ультраструктура, апоптоз.

Мета роботи: Електронномікроскопічне дослідження окремої та поєднаної дії опромінення та хемопрепарату «Етопозид» на ультраструктуру клітин карциноми Герена та розвиток апоптозу у ранні терміни.

Матеріали та методи: За допомогою стандартних методів електронної мікроскопії досліджена ультраструктура клітин карциноми Герена після локального рентгенівського опромінення пухлини у дозі 5 Гр, введення хемопрепарату «Етопо-

Objective: To perform electron microscopy of separate and combination effect of irradiation and chemotherapy with etoposide on the ultrastructure of Guerin's carcinoma cells and apoptosis development at various terms.

Material and Methods: Standard methods of electron microscopy were used to investigate the ultrastructure of Guerin's carcinoma cells after local x-ray exposure at a dose of 5 Gy, administration of etoposide at a dose of 8 mg/kg, and combination of chemotherapy and radiation therapy (irradiation at a dose of 5 Gy 18 hours after etoposide administration). The investigation was performed 3, 6, and 24 hours after the exposure. Intact tumors served as controls.

Results: It was determined that irradiation resulted in occurrence of the cells in the state of apoptosis death 3 hours after the irradiation. Their ultrastructure was characterized by nucleus with chromatin accumulating like dark masses along the nucleus membrane while granular protein substance (obviously enzymes of protein metabolism) appeared in the karyoplasms. The cytoplasm created scalloped processes and apoptosis bodies, the structure of its organelles was damaged. Six hours after the exposure apoptosis processes decelerated, 24 hours later tumor cells (TC) in this state were not observed. Under the influence of etoposide apoptotic death of TC was not distinct and this was not observed 6 hours later. Considerably greater effect was produced by combination use of chemotherapy and radiation therapy. With this apoptosis index significantly increased at all terms of the investigation with its maximum 6 hours after the exposure. Various stages of its development were observed: from TC with almost normal cytoplasm to the cells with fragmented cytoplasm, or cell death occurred. Apoptosis processes finished 24 hours after the exposure.

It was determined that etoposide administration inhibited division processes, especially 24 hours after the administration, which corresponded to the mechanism of its action. Considerable mitotic activities were observed in all terms after chemoradiation treatment.

Conclusion: Irradiation and etoposide used separately are weak inducers of apoptosis in Guerin's carcinoma. Etoposide administered 18 hours before irradiation creates conditions for considerable stimulation of apoptosis processes at early terms after the exposure with pronounced maximum 6 hours after the exposure. Etoposide decelerates mitotic activity of Guerin's carcinoma cells which manifests 24 hours after the administration both at separate use and in combination with irradiation and is accompanied by increase of the number of small TC. Radiation effect on the Guerin's carcinoma ultrastructure is appearance of bi- and polynuclear cells as well as those with micronuclei.

Key words: radiation, etoposide, Guerin's carcinoma, ultrastructure, apoptosis.

зид» у дозі 8 мг/кг та поєднаного застосування хемо- та радіаційного факторів (опромінення у дозі 5 Гр через 18 годин після введення етопозиду). Дослідження проводили через 3, 6 та 24 год. За контроль правили інтактні пухлини.

Результати: Встановлено, що опромінення пухлини через 3 год призводить до з'явлення клітин у стані апоптичної загибелі. Характерним для їх ультраструктури є ядро, хроматин у якому збирається темними масами вздовж ядерної мембрани, тоді як у каріоплазмі виявляється гранулярна білкова субстанція, представлена, очевидно, ферментами нуклеїнового обміну. Цитоплазма утворює фестончасті вирости та апоптозні тільця, а її органели мають помітно порушену структуру. Через 6 год процеси апоптозу вщухають, а на 1-шу добу пухлинні клітини (ПК) у цьому стані не виявляються. При дії етопозиду апоптична загибель ПК виражена слабо і вже через 6 год не спостерігається. Значно більший ефект викликає поєднане застосування хемо- та променевого факторів. При цьому індекс апоптозу вірогідно зростає в усі терміни дослідження з максимумом на 6 год, причому спостерігаються різні етапи його розвитку: від тих ПК, у яких цитоплазма має майже нормальну структуру, до тих, де вона фрагментується, або відбувається загибель клітин. Процеси апоптозу починають завершуватися на 1-шу добу.

Встановлено, що введення етопозиду гальмує процеси поділу, особливо через добу після застосування, що узгоджується з основним механізмом його дії. Зниження мітотичної активності спостерігається і в усі терміни після хемопроменевої дії.

Висновки: Радіація та етопозид, застосовані окремо, є слабкими індукторами апоптозу в карциномі Герена. Етопозид, уведений за 18 год до дії радіації, створює умови для значної стимуляції процесів апоптозу у ранні терміни після опромінення з вираженим максимумом на 6 год. Етопозид гальмує мітотичну активність клітин карциноми Герена, що проявляється через одну добу як при окремому застосуванні, так і в комбінації з опроміненням і супроводжується зростанням кількості ПК невеликого розміру. Характерним для дії радіації на ультраструктуру клітин карциноми Герена є з'явлення дво- та багатоядерних клітин, а також клітин з мікроядрами.

Ключові слова: радіація, етопозид, пухлина Герена, ультраструктура, апоптоз.

Однією з головних проблем онкології є підвищення ефективності лікування раку. Серед методів, які найчастіше використовуються для терапії злоякісних пухлин, перше місце посідає променева терапія (ПТ) [1]. Однак вона має свої обмеження, пов'язані як з первинною радіорезистентністю, так і вторинною, яка виникає у процесі лікування [2, 3]. Вважають, що причиною цього може бути порушення у ракових клітинах процесів апоптозу [4, 5], одного з видів загибелі клітин, який розвивається як при ураженні ДНК ядра, так і при активації інших шляхів апоптозу, що призводить до каскаду специфічних реакцій самознищення клітин. Такі порушення можуть відбуватися внаслідок мутацій проапоптичних генів, зокрема p53, та при активації антиапоптичного білка Bcl2 [5, 6]. Тому в сучасній онкології актуальним є напрямок досліджень, пов'язаних зі стимуляцією апоптозу за допомогою модифікувальних засобів, таких як таргетні агенти, специфічні до різних ланок цього процесу, та звичайні протипухлинні препарати [4, 5]. Серед морфологічних методів для вивчення процесів апоптозу найчастіше використовують гістологічні методи [7], але точно ідентифікувати його стадії можна лише на ультраструктурному рівні [8], хоча застосування електронномікроскопічного методу дещо обмежене, внаслідок його складності та високої вартості [7]. Відомо також, що апоптоз розвивається відразу після застосування радіаційних та хімічних факторів з максимумом на 4–6 годині через 24 години клітини в такому стані вже не виявляються

[3, 5], тому морфологічне вивчення впливу цих чинників слід виконувати лише у ранній період. Вексперименті дослідження радіорезистентності та радіосенсибілізуючої дії різних хемопрепаратів часто проводиться на карциномі Герена, яка є досить стійкою до опромінення пухлиною, і вивчення процесів апоптозу може дозволити виявити деякі особливості механізмів його розвитку в цих умовах.

У зв'язку з цим метою даної роботи стало електронномікроскопічне дослідження окремої та поєднаної дії опромінення та хемопрепарату «Етопозид» на ультраструктуру клітин карциноми Герена та розвиток апоптозу в ранні терміни.

Методика дослідження

Експерименти проведено на 30 щурах масою тіла 160–180 г на 10–12-ту добу після перещелення карциноми Герена, коли розміри пухлинного вузла досягали у діаметрі 1,5–2,0 см. Пухлину опромінювали локально на рентгенівському апараті РУМ-17 за стандартних технічних умов: напруга — 190 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри: 0,5 мм Cu + 1 мм Al, доза опромінення — 5 Гр. Хемопрепарат етопозид «Ебева» вводили внутріочереивно у дозі 8 мг/кг маси тіла.

Тварин розподіляли методом випадкового добору на такі групи: 1 — інтактний контроль (3 шт.); 2 — опромінення (9 шт.); 3 — введення етопозиду (9 шт.); 4 — введення етопозиду + опромінення через 18 годин.

Тварин декапітували через 3, 6 та 24 години після опромінення у групах 2 і 4, та в такі ж терміни після введення етопозиду (група 3) з дотриманням правил евтаназії згідно з Європейською конвенцією «Про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1998) та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Київ, 2006).

Дослідження ультраструктури карциноми Герена проводили за стандартними методами електронної мікроскопії [8]. Кусочки пухлин витримували спочатку у глю-

таральдегідному фіксаторі за Карновським, потім у тетраоксиді осмію за Паладе. Після дегідратації в етанолі зростаючої концентрації та ацетоні матеріал заливали у суміш епоксидних смол епон-аралдит та полімеризували протягом 36 годин при 56 °С. З одержаних блоків виготовлювали напівтонкі зрізи на ультрамікромомі УМТП-4 Сумського ВО «Електрон» та забарвлювали метиленовим синім на 1 % тетрабораті натрію. Ультратонкі зрізи виготовлювали на тому ж мікромомі, контрастували у 2 % розчині уранілу ацетату та цитраті свинцю за Рейнольдсом та аналізували в електронному мікроскопі EM-125 того ж виробничого об'єднання.

На напівтонких зрізах підраховували мітотичний індекс (кількість мітозів на 100 пухлинних клітин) у 10 полях зору, а на ультратонких — індекс апоптозу (кількість клітин у стані апоптозу на 100 пухлинних клітин) у 5 полях зору для кожної тварини.

Одержані дані обробляли методами описової статистики та за критерієм Стьюдента за допомогою пакета програм для ПК «Biostat».

Результати та їх обговорення

Інтактна карцинома Герена складається з клітин, які мають округлі світлі ядра з деконденсованим хроматином, 1–2 великими темними ядерцями (рисунок 1). Основним компонентом цитоплазми є численні рибосоми та полісоми, серед яких виявляється небагато мітохондрій та коротких профілей гранулярної ендоплазматичної сітки (гЕПС), окремі лізосоми та везикули. Подібна структура притаманна клітинам, функція яких спрямована переважно на вироблення продуктів білкового синтезу для власних потреб, тобто для росту та поділу. Трапляються також темні пухлинні клітини (ПК) з низькою функціональною активністю, клітини у стані мітотичного поділу. Характерною рисою карциноми Герена є наявність ділянок некрозу, в яких присутні нейтрофільні лейкоцити та макрофаги. Процеси апоптозу не спостерігаються (таблиця 1).

Опромінення пухлини у дозі 5 Гр через 3 години призводить до з'явлення клітин у стані апоптозу (рисунок 2). Хроматин у ядрі цих клітин розташовується темними масами на периферії, що є

характерною ознакою апоптозу, ядрце представлено гранулярним компонентом, тоді як його сітчаста частина відсутня, оскільки вона, як і хроматин, складається з ДНК і піддається руйнуванню при апоптозі. Основний об'єм каріоплазми займає білкова речовина, складовими якої можуть бути ферменти нуклеїнового обміну. Ядерна мембрана чітка, зберігає свою цілісність, перинуклеарний простір місцями розширений. Цитоплазма таких клітин має значно порушену ультраструктуру: у цистернах гЕПС накопичується білкова речовина, мітохондрії набрякли, багато скупчень дрібних везикул та лізосом, з'являються пучки тонких мікрофібрил, які ніколи не спостерігаються у клітинах інтактної пухлини, окремі ліпідні краплини.

Подібні зміни можуть бути пов'язані з порушенням функціональної діяльності клітин унаслідок ураження ядра та відсутності його керуючого впливу, а також активації каспазного каскаду. Цитоплазма утворює фестончасті вирости, які відокремлюються, утворюючи, так звані, апоптозні тільця (рисунок 3). Реакцією більшості інших ПК на опромінення в цей термін стає значний набряк мітохондрій, розширення цистерн гЕПС (рисунок 4), з'явлення ліпідних краплин у цитоплазмі. Дещо спотворюється форма ядер. Трапляються також клітини з великими фагосомами (рисунок 5). Мітотична діяльність залишається на вихідному рівні (таблиця 2).

Через 6 годин після дії радіації індекс апоптозу падає до нульових значень, але у деяких некротичних клітинах виявляються ядра з ознаками, властивими для клітин у такому стані, зокрема, конденсація хроматину в ядерній мембрані, просвітлення нуклеоплазми. В інших пухлинних клітинах мітохондрії залишаються набряклими, цистерни гЕПС розширені. Трапляються двоя-

Таблиця 1

Індекс апоптозу після опромінення, введення етопозиду та поєднаного застосування обох чинників
Apoptosis index after the exposure, administration of etoposide, and combination use of the both factors

Серія дослідів	3 години		6 годин		24 години	
	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Контроль (інтактні пухлини)	15	0	–	–	–	–
Опромінення	15	0,13 ± 0,09	15	0	15	0
Уведення етопозиду	15	0,07 ± 0,07	15	0	15	0
Уведення етопозиду + опромінення	15	0,40 ± 0,19 *	15	0,80 ± 0,34 ***	15	0,40 ± 0,13 ***

Примітка: Вірогідно порівняно: * — з контролем, ** — із серією опромінення; p < 0,05.

Мітотичний індекс після опромінення, введення етопозиду та поєднаного застосування обох чинників
Mitosis index after the exposure, administration of etoposide, and combination use of the both factors

Серія дослідів	3 години		6 годин		24 години	
	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Контроль (інтактні пухлини)	30	$0,73 \pm 0,14$	–	–	–	–
Опромінення	30	$0,77 \pm 0,16$	30	$0,67 \pm 0,15$	30	$1,10 \pm 0,18$
Уведення етопозиду	30	$0,87 \pm 0,16$	30	$0,60 \pm 0,14$	30	0*
Уведення етопозиду + опромінення	30	$0,27 \pm 0,11^{***}$	30	$0,30 \pm 0,10^{***}$	30	$0,33 \pm 0,13^{***}$

Примітка: Вірогідно порівняно: * — з контролем, ** — із серією опромінення; $p < 0,05$.

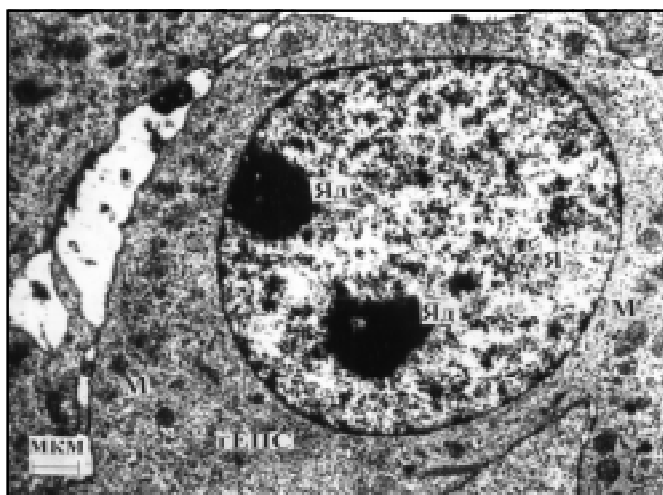


Рисунок 1. Пухлинна клітина інтактної карциноми Герена зі світлим ядром, чіткими ядрцями, різними органелами у цитоплазмі. Я — ядро, Яд — ядерце, М — мітохондрія, rЕПС — гранулярна ендоплазматична сітка

Fig. 1. An intact Guerin's carcinoma cell with a light nucleus, distinct nucleoli, various organelles in the cytoplasm. Я — nucleus, Яд — nucleolus, М — mitochondria, rЕПС — granular endoplasmatic reticulum

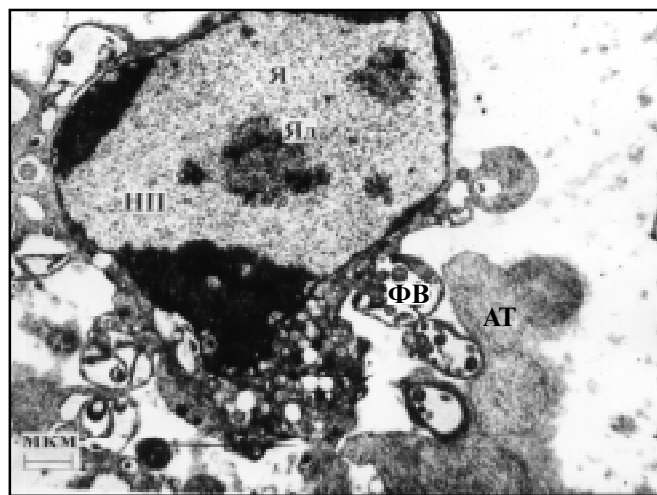


Рисунок 3. Пухлинна клітина карциноми Герена у стані апоптозу через 3 год після опромінення. Фрагментація цитоплазми. ФВ — фестончасті вирости цитоплазми, АТ — апоптозне тільце

Fig. 3. Guerin's carcinoma cell in the state of apoptosis 3 hours after irradiation. Cytoplasm fermentation. ФВ — scalloped processes of the cytoplasm, АТ — apoptosis body

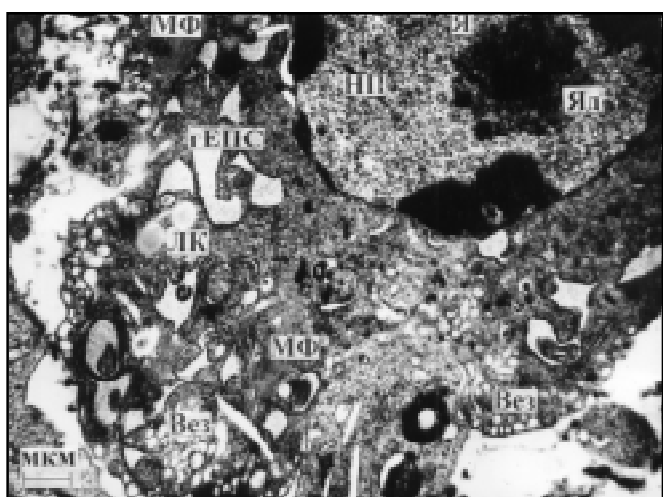


Рисунок 2. Пухлинна клітина карциноми Герена у стані апоптозу через 3 год після опромінення. НП — нуклеоплазма, Вез — везикули, МФ — мікрофібрили, ЛК — ліпідні краплини

Fig. 2. Guerin's carcinoma cell in the state of apoptosis 3 hours after irradiation. НП — nucleoplasm, Вез — vesicles, МФ — microfibrillae, ЛК — lipid drops

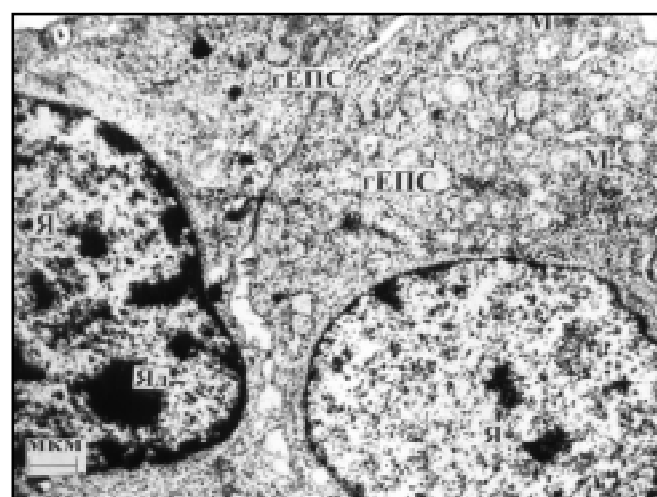


Рисунок 4. Пухлинні клітини карциноми Герена, які містять у цитоплазмі розширені профілі rЕПС та набряклі мітохондрії, через 3 год після опромінення

Fig. 4. Guerin's carcinoma cell containing dilated granular endoplasmatic reticulum and swollen mitochondria in the cytoplasm, 3 hours after the exposure

дерні клітини (рисунок 6) і форми зі значно спотвореним ядром та наявністю мікроядер (рисунок 7). Мітотичний індекс не відхиляється від нормальних значень.

На 1-шу добу після опромінення клітини у стані апоптозу відсутні, а популяція пухлинних клітин стає досить поліморфною. Частина з них має ультраструктуру, подібну до такої у клітинах інтактної пухлини: світлі ядра з крупними темними ядерцями, звичайного вигляду мітохондрії, невеликі профілі гЕПС у цитоплазмі, багаті на рибосоми та полісоми. У ПК іншого типу цистерни гЕПС значно розширені, мітохондрії набрякли, що надає клітинам «ажурного» вигляду (рисунок 8).

Присутні також двоядерні клітини, ПК з мікроядрами. Зростає мітотична активність, але внаслідок великої розбіжності даних це підвищення не визнано вірогідним.

Таким чином, після опромінення процеси апоптозу в пухлині Герена виявляються лише через 3 години, але в подальші терміни відсутні, що може бути однією з ознак її радіорезистентності. Характерними для дії радіації є набряк мітохондрій у ранній період (3–6 годин), а також наявність дво- та багатоядерних клітин та мікроядер у деяких ПК (6 годин, 1 доба), що може свідчити про мутагенні процеси. Проте більшість клітин через добу має нормальну будову.

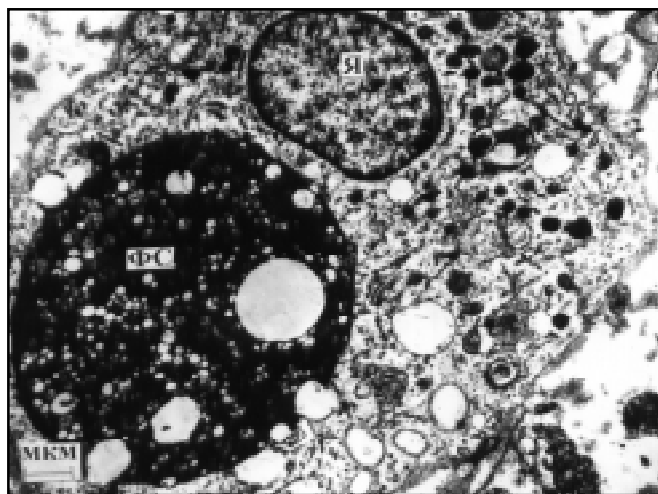


Рисунок 5. Велика фагосома у цитоплазмі клітини карциноми Герена через 3 год після опромінення. ФС — фагосома

Fig. 5. A large phagosome in the cytoplasm of the cell of Guerin's carcinoma 3 hours after the exposure. ФС — phagosome

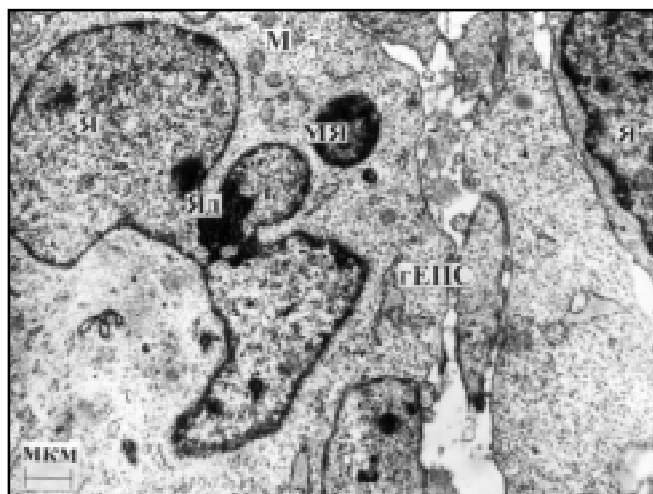


Рисунок 7. Пухлинна клітина карциноми Герена зі спотвореним ядром через 6 год після опромінення. МЯ — мікроядро

Fig. 7. Guerin's carcinoma cell with a damaged nucleus 6 hours after the exposure. МЯ — micronucleus

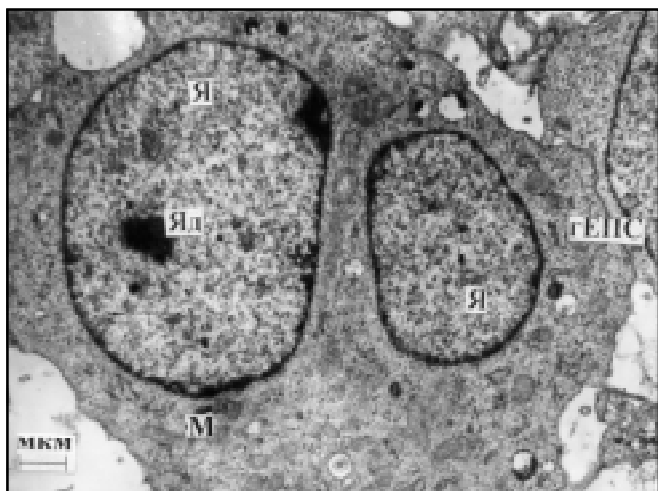


Рисунок 6. Двоядерна пухлинна клітина карциноми Герена через 6 год після опромінення

Fig. 6. Binuclear Guerin's carcinoma cell 6 hours after the exposure

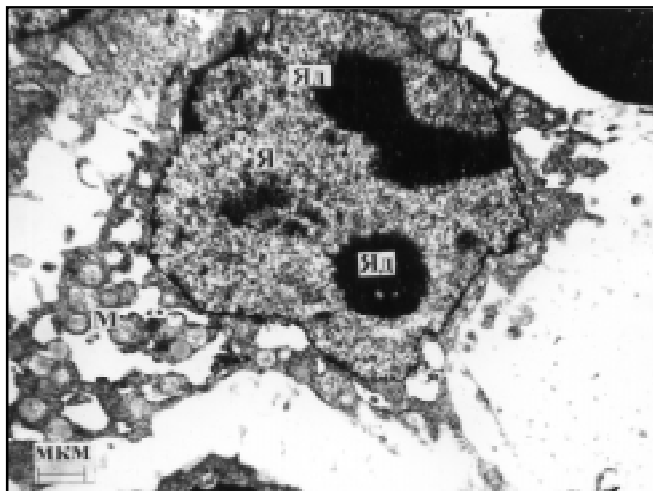


Рисунок 8. Пухлинна клітина карциноми Герена з «ажурною цитоплазмою» через 24 год після опромінення

Fig. 8. Guerin's carcinoma cell with laced cytoplasm 24 hours after the exposure

При введенні етопозиду процеси апоптозу виражені слабо. Так, на 3-тю добу пухлинні клітини у цьому стані спостерігаються лише в одному випадку. Тонка будова більшості ПК відповідає нормі, однак, серед них з'являються форми невеликого розміру, окремі клітини з розширеними цистернами гЕПС та набряклими мітохондріями, а також ПК з фагосомами або з вакуолями, які залишаються після їх розсмоктування. Показник мітотичної активності не відрізняється від норми.

Через 6 годин апоптичної загибелі не відзначається, а пухлинні клітини мають переважно звичайну ультраструктуру, хоча дещо збільшується кількість форм з розширеними цистернами гЕПС та набряклими мітохондріями. Трапляються ПК з 2–3 ядрами, серед яких присутні і мікроядра, темні клітини, ПК з фагосомами. Кількість мітозів залишається на рівні норми.

Як і на попередній термін, через 1 добу після введення етопозиду ПК у стані апоптозу відсутні. Проте спостерігається різке та вірогідне падіння мітотичного індексу. При цьому в ультраструктурі ПК не відбувається якихось особливих змін. Помітно збільшується лише фракція дрібних форм (рисунок 9), що може бути пов'язано із впливом даного препарату на ріст пухлинних клітин.

Таким чином, дослідження дії етопозиду на стан ПК карциноми Герена показало, що введення цього препарату майже не впливає на розвиток процесів апоптозу. Однак етопозид помітно знижує мітотичну діяльність ПК, оскільки, як відомо, він є антагоністом топоізомерази [9], ферменту, який відповідає за скручування та зв'язки спіралей ДНК, що призводить до їх розривів та порушує тим самим реплікацію ДНК. Крім того, етопозид якимось чином впливає на процеси росту клітин, про що свідчить з'явлення у їх популяції дрібних клітин, а це також може гальмувати мітотичну активність.

Опромінення у дозі 5 Гр через 18 годин після введення етопозиду викликає значно більший ефект, ніж дія кожного із застосованих факторів окремо. Так, уже через 3 години після дії радіації вірогідно зростає кількість ПК у стані апоптичної загибелі, які мають ядра характерного вигляду. Цитоплазма в них здебільшого темна, органели майже не виявляються, а в деяких клітинах від неї залишається тільки тонка смужка, яка оточує ядро (рисунок 10). Це може свідчити про завершення

процесів апоптозу, які почалися раніше за досліджуваний термін, тим більше, клітини подібного вигляду фагоцитуються сусідніми клітинами, де й виявляються поруч із вторинними лізосомами (рисунок 11). Структура інших пухлинних клітин досить різноманітна. Поряд із формами звичайного вигляду спостерігаються ПК з розширеними цистернами гЕПС та набряклими мітохондріями, групи дрібних клітин. Вірогідно падає мітотична активність клітин пухлини Герена.

Через 6 годин після введення етопозиду та опромінення процеси апоптозу нарастають, причому спостерігаються різні етапи його розвитку: від тих ПК, де цитоплазма має майже нормальну структуру, до тих, де цитоплазма фрагментується, або відбувається некротизація апоптичних клітин (рисунок 12). Продовжує збільшуватися частка ПК з розширеним гЕПС та набряклими мітохондріями і клітин зменшеного розміру. Мітотичний індекс залишається вірогідно зниженим.

У серії з поєднаним застосуванням хемопрепарату та радіації на 1-шу добу після опромінення процеси апоптозу починають завершуватися, про що свідчить зниження кількості ПК у такому стані, а також те, що вони втрачають не тільки свою цитоплазму, але й плазматичну мембрану, а ранні етапи апоптозу не виявляються. Результатом дії радіації можна вважати спотворення форми ядра, з'явлення багатоядерних клітин, набрякання мітохондрій та розширення профілів гЕПС у цитоплазмі багатьох ПК, тоді як для дії етопозиду характерним є переважання дрібних клітинних форм та вірогідне гальмування поділу.

Таким чином, поєднана дія етопозиду та опромінення призводить до значної стимуляції процесів апоптозу в усі терміни спостереження та до тривалого спаду мітотичної активності. Можливо, це пов'язано з тим, що на момент опромінення досягається максимум дії етопозиду на стан ДНК, що, з одного боку, гальмує мітотичну активність ПК, проте з іншого — робить її уразливішою до дії радіації, а порушення у ДНК, очевидно, запускають процеси апоптозу.

Проведені дослідження показали, що як опромінення, так і етопозид є слабкими індукторами апоптозу у карциномі Герена, що, очевидно, зумовлює її радіо- та хеморезистентність [3]. Причиною цього можуть бути мутації проапоптичних генів та (або) надмірна продукція антиапоптичних

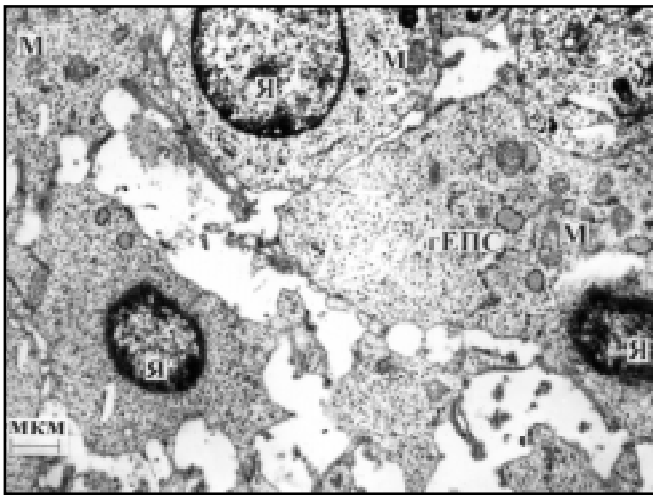


Рисунок 9. Дрібні пухлинні клітини карциноми Герена через 24 год після введення етопозиду

Fig. 9. Small Guerin's carcinoma cell 24 hours after etoposide administration

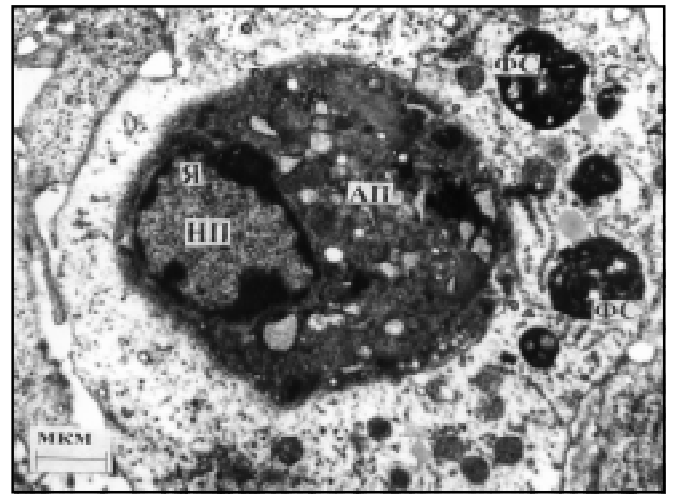


Рисунок 11. Фагоцитована пухлинна клітина у стані апоптозу через 3 год після опромінення та попереднього введення етопозиду за 18 год до дії радіації. АП — пухлинна клітина у стані апоптозу

Fig. 11. Phagocytosed tumor cell in the state of apoptosis 3 hours after the exposure and preliminary administration of etoposide 18 hours before the exposure. АП — tumor cell in the state of apoptosis

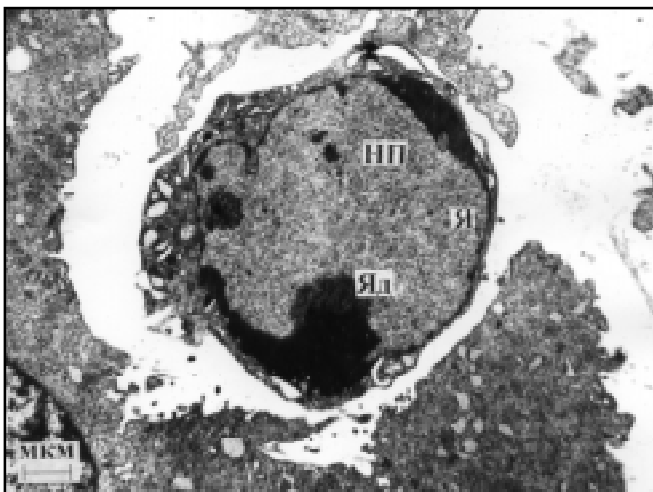


Рисунок 10. Пухлинна клітина карциноми Герена у стані апоптозу з вузькою смужкою цитоплазми через 24 год після введення етопозиду

Fig. 10. Guerin's carcinoma cell in the state of apoptosis with a narrow band of the cytoplasm 24 hours after etoposide administration

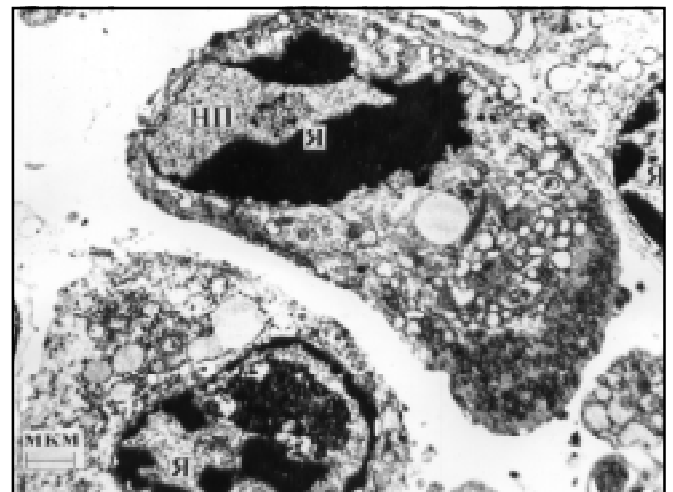


Рисунок 12. Некротизована пухлинна клітина карциноми Герена з апоптичним ядром через 6 год після опромінення та попереднім введенням етопозиду за 18 год до дії радіації

Fig. 12. Necrotized Guerin's carcinoma cell with apoptotic nucleus 6 hours after the exposure and preliminary administration of etoposide 18 hours before the exposure

факторів, які блокують апоптоз [5, 6]. Якщо це генетично зумовлений дефект порушення апоптозу, то навряд чи вдасться домогтися його стимуляції. Однак значний сплеск апоптозного індексу після опромінення на фоні дії етопозиду заперечує такий сценарій. Скоріш за все можливим є другий варіант — блокада апоптозу, яку, певно, долає поєднане застосування обох цих чинників пригніченням синтезу антиапоптичних протеїнів. Слід зазначити, що при введенні етопозиду максимум такого гальмування, очевидно, досягається не раніше 18–24 годин, у момент найбільшого

ефекту цього препарату. Крім того, етопозид та опромінення разом викликають значно більше ураження ДНК, ніж кожний окремо, і сумарним ефектом стає потенціювання процесів апоптозу.

Висновки

1. Радіація та етопозид, застосовані окремо, є слабкими індукторами апоптозу в карциномі Герена.
2. Етопозид, уведений за 18 годин до дії радіації, створює умови для значної стимуляції процесів

апоптозу у ранні терміни після опромінення з вираженим максимумом на 6 годин.

3. Етопозид гальмує мітотичну активність клітин карциноми Герена, що проявляється через одну добу як при окремому застосуванні, так і в комбінації з опроміненнями і супроводжується зростанням кількості пухлинних клітин невеликого розміру.

4. Характерним для дії радіації на ультраструктуру клітин карциноми Герена є з'явлення дво- та багатоядерних клітин та клітин із мікроядрами.

Література

1. Іванкова В.С. // УРЖ. – 2005. – Т. XIII, вип. 3. – С. 300–302.
2. Зінченко В.А., Соляник Г.І., Барабой В.А., Кулик Г.І. // Там же. – 1995. – Т. III, вип. 4. – С. 364–365.
3. Зінченко В.А. // Там же. – 1998. – Т. III, вип. 3. – С. 349–353.
4. Дьоміна Е.А., Іванкова В.С. // Там же. – 2010. – Т. XVIII, вип. 2. – С. 175–178.
5. Meun R.E., Milas L., Ang K.K. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2009. – Vol. 85, № 2. – P. 107–115.
6. Fluda S. // *Int. J. Cancer.* – 2009. – Vol. 124. – P. 511–515.
7. Фільченков О.О., Стойка Р.С. *Апоптоз і рак.* – К.: Моріон. – 1999. – 184 с.
8. *Electron microscopy in biology. A practical approach* / Ed. by J.R. Harris. – New York: Oxford University Press, 1991. – 308 p.
9. Олійниченко П.И., Булкина З.П., Синиборова Т.И. *Справочник по полихимиотерапии опухолей.* – К.: Здоров'я, 2000. – 294 с.

Надходження до редакції 21.01.2013.

Прийнято 12.02.2013.

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