

УДК 616-006.6:615.849.114

ОЛЬГА ПЕТРІВНА ЛУКАШОВА

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

## ВПЛИВ ДРІБНОФРАКЦІОНОВАНОГО ІКС-ВИПРОМІНЕННЯ У СУМАРНІЙ ДОЗІ 10 ГР ТА ЕТОПОЗИДУ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛІТИН КАРЦИНОМИ ГЕРЕНА

**Мета роботи.** Електронно-мікроскопічне вивчення структурно-функціонального стану клітин карциноми Герена та процесів розвитку апоптозу після введення препарату «Етопозид» та локального ікс-опромінення пухлини у сумарній дозі 10 Гр при застосуванні разових фракцій 2 Гр.

**Матеріали і методи.** За допомогою стандартних методів електронної мікроскопії досліджена ультраструктура (УС) пухлинних клітин (ПК) та підраховано індекси мітозу та апоптозу (АП) через 6 та 24 год. після локального ікс-опромінення карциноми Герена у сумарній дозі 10 Гр (5 фракцій по 2 Гр щоденно) та введення хіміопрепарату «Етопозид» у дозі 8 мг/кг за 18 годин до останньої фракції опромінення.

**Результати.** Встановлено, що введення етопозиду приводить до вірогідного зниження мітотичного індексу в пухлині через 6 годин, з'явленню дрібних пухлинних клітин на 1-шу добу, незначних змін індексу АП. Характерним для дії радіації є поява у пухлині дво- та багатоядерних клітин, а також присутність у ПК плейоморфних ядер та мікроядер. У цитоплазмі зменшується кількість вільних рибосом та полісом та зростає кількість профілей гранулярної ендоплазматичної сітки. Вірогідно падає рівень мітотичного індексу, а індекс АП підвищується з максимумом на 6-ту годину. При сумісній дії радіації та етопозиду УС клітин карциноми Герена подібна до тієї, яка спостерігається при одному опроміненні, до чого приєднується наявність дрібних ПК. В обидва терміни відзначаються значуще падіння рівня мітотичного індексу та достовірне зростання індексу АП.

**Висновки.** Основною дією етопозиду на клітини карциноми Герена є короткочасне гальмування процесів ділення у ранній термін після введення з наступним поновленням через 24 год., що супроводжується появою дрібних ПК на 1-шу добу. Етопозид майже не впливає на ультраструктуру більшості ПК і є слабким індуктором апоптозу у пухлині Герена. Дрібнофракціоноване тривале опромінення викликає значні ультраструктурні зміни у клітинах карциноми Герена, які свідчать про радіаційне ураження ядер, та інверсію функції пухлинних клітин з росту та ділення до білково-синтетичної діяльності. Вірогідне гальмування мітотичної активності в обидва терміни дослідження може бути наслідком цих процесів. Короткочасне зростання індексу апоптозу на 6-ту годину викликано, очевидно, дією останньої фракції опромінення. При сумісному застосуванні радіації та етопозиду виразні зміни ультраструктури пухлинних клітин обумовлені опроміненням, наявність дрібних ПК — впливом хіміопрепарату, а у зниження мітотичної активності та активації процесів АП свій вклад вносять обидва чинники.

**Ключові слова:** радіація, етопозид, карцинома Герена, ультраструктура, апоптоз.

Відомо, що променева терапія та хіміотерапія онкологічних захворювань мають певні обмеження, пов'язані з резистентністю злоякісних новоутворень (первинною та вторинною) до радіації та хімічних речовин [1, 2], однією з причин чого вважають порушення процесів апоптозу в пухлинах [3]. У зв'язку з цим застосування індукторів апоптичної загибелі, до яких відносять також протипухлинні препарати, можуть подолати резистентність пухлин до дії радіації, що дозволить підвищити ефективність лікування раку [4]. Надійною базою для вивчення впливу різних видів радіації та схем опромінення, а також додаткових факторів є експериментальні дослідження на пухлинах, прищеплених тваринам. Так, ціла низка

досліджень проведена на карциномі Герена, яка є радіорезистентною пухлиною, що дає можливість застосування цієї моделі для вивчення засобів стимуляції апоптичної загибелі за допомогою хіміопрепаратів [5, 6]. Так, за допомогою електронно-мікроскопічного методу показано, що введення етопозиду з подальшим опроміненням у дозі 5 Гр приводить до значної активації апоптозу у ранні терміни з максимумом на 6-ту годину після опромінення, тоді як обидва фактори (кожний окремо) є слабкими його індукторами у карциномі Герена [7]. Про посилення процесів апоптозу свідчать також результати дослідження рівня керамідів у крові та пухлині Герена після сумісного використання хіміопрепарату «Етопозид» та локального фракціонованого опромінення пухлини Герена у сумарній

© О. П. Лукашова, 2016

дозі 10 Гр [8, 9]. В цих роботах [4–9] застосовували великофракціонований режим опромінення з разовою дозою 5 Гр. Для того, щоб наблизити умови експерименту до умов променевої терапії онкологічних хворих, доцільно проводити фракціоноване опромінення у менших разових дозах.

Метою даної роботи стало електронно-мікроскопічне вивчення ультраструктури клітин карциноми Герена та процесів розвитку апоптозу після введення етопозиду і локального ікс-опромінення пухлини у сумарній дозі 10 Гр при застосуванні разових фракцій 2 Гр.

## МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти проведено на 30 щурах масою тіла 160–180 г на 10–12-ту добу після перещеплення карциноми Герена. Локальне опромінення пухлини проводили на рентгенівському апараті РУМ-17 за стандартних технічних умов: (напруга — 190 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри: 0,5 мм Cu + 1,0 мм Al) щоденно в разовій дозі 2 Гр до досягнення сумарної дози 10 Гр. Хіміопрепарат етопозид «Тева» вводили внутріочеревинно у дозі 8 мг/кг маси тіла за 18 годин до останньої фракції опромінення. Тварин декапітували через 6 та 24 години після опромінення, та в ті ж терміни після введення етопозиду, 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).

Тварин розподіляли на групи:

1-ша — інтактний контроль (7 шт.);

2-га — введення етопозиду (7 шт.);

3-тя — опромінення (8 шт.);

4-та — введення етопозиду та опромінення (8 шт.).

Матеріал для ультрамікроскопічного дослідження обробляли за стандартними електронно-мікроскопічними методиками [10]. Зразки пухлинної тканини фіксували спочатку у глутаральдегідному фіксаторі за Карновським, а потім — в 1 % тетраоксиді осмію за Паладе. Після зневоднювання в етанолі зростаючої концентрації 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). Зрізи для світлової мікроскопії забарвлювали у 1 % метиленовому синьому на 1 % тетрабораті натрію, ультратонкі зрізи контрастували в насиченому розчині ураніацетату та цитраті свинцю за Рейнольдсом і аналізували в електронному мікроскопі ЕМ-125 (Сумське ВО «Електрон», Україна). На напівтонких зрізах підраховували мітотичний індекс (кількість мітозів на 100 пухлинних клітин), а на ультратонких — індекс апоптозу (кількість клітин у стані апоптозу на 100 пухлинних клітин) у 5 полях зору для кожної тварини.

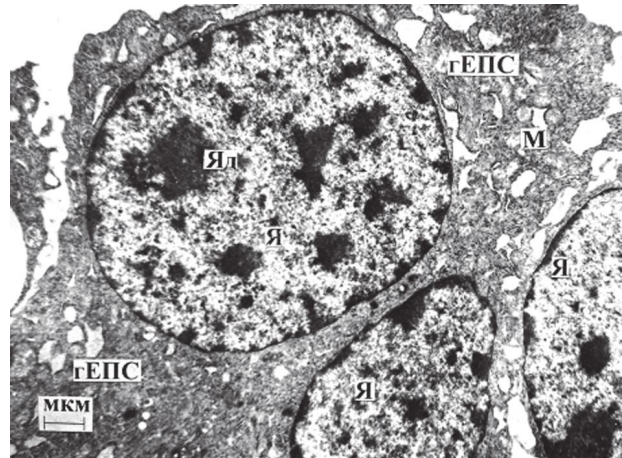
Одержані дані обчислювали методами описової статистики з використанням критерію Стьюдента

за допомогою пакета програм для ПК «Biostat», а також непараметричного критерію максимального правдоподібної оцінки достовірності (Рмп) [11].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ультраструктура інтактної карциноми Герена докладно описана у попередніх роботах [5, 6].

Через 6 год. після введення етопозиду ультраструктура більшості пухлинних клітин залишається майже незмінною. Лише у деяких з них ядра набувають звивистої контури, а у цитоплазмі цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки (гЕПС) розширюються, втрачають рибосоми, а білковий вміст розріджується; мітохондрії набрякають та просвітлюються. Це може бути ранньою індивідуальною реакцією клітин на дію препарату (рис. 1). Застосування етопозиду призводить до вірогідного падіння мітотичної активності (табл. 1), що є характерним для механізму його дії, внаслідок якої порушується реплікація ДНК [12]. Процеси апоптозу на цей термін стимулюються незначно (табл. 2).



**Рис. 1.** Клітина карциноми Герена з конденсованим хроматином у ядрі, набрякними мітохондріями та розширеними профілями гЕПС у цитоплазмі через 6 год. після введення етопозиду.  
Я — ядро, Ял — ядерце, М — мітохондрія, гЕПС — гранулярна ендоплазматична сітка, МКМ — збільшення

Таблиця 1

### Мітотичний індекс пухлини Герена після опромінення та введення етопозиду

Серія дослідів	Термін, год.			
	6		24	
	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Контроль, інтактна пухлина	35	1,46 ± 0,22	—	—
Етопозид	15	0,67 ± 0,19 ***	20	1,50 ± 0,25 ***
Опромінення	15	0,73 ± 0,21 ***	25	0,68 ± 0,16 ***
Опромінення + етопозид	15	0,07 ± 0,07 *	25	1,08 ± 0,21 ***

Примітки: вірогідно у порівнянні \* — з групою інтактного контролю; \*\* — з групою «опромінення та етопозид»; \*\*\* — з терміном 6 год.; P < 0,05.



Таблиця 2

**Індекс апоптозу в пухлині Герена після опромінення та введення етопозиду**

Серія дослідів	Термін, год.			
	6		24	
	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Контроль, інтактна пухлина	35	0,03 ± 0,03	–	–
Етопозид	15	0,07 ± 0,07**	20	0,15 ± 0,08 Рмп *
Опромінення	15	0,53 ± 0,22*	25	0,16 ± 0,07 Рмп *
Опромінення + етопозид	15	0,67 ± 0,23*	25	0,32 ± 0,13*

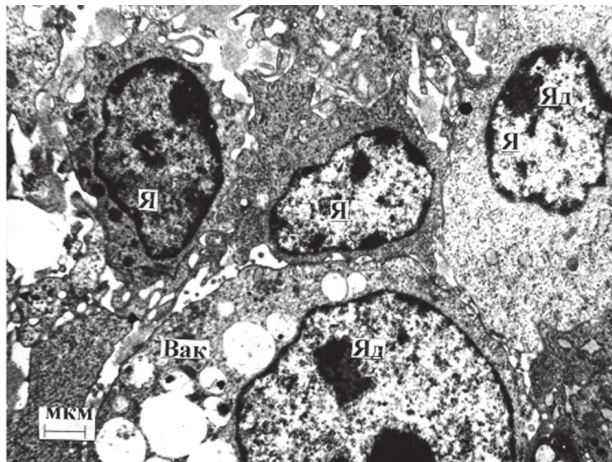
Примітки: вірогідно у порівнянні \* — з групою інтактного контролю; \*\* — вірогідно у порівнянні з групою «опромінення та етопозид»; P < 0,05; Рмп — вірогідність за непараметричним критерієм.

На 1-шу добу після застосування препарату структура більшості ПК не відрізняється від тієї, що спостерігалася у попередній термін. Характерним є поява дрібних клітин (рис. 2), що може бути пов'язано із властивістю етопозиду гальмувати ріст клітин. Відзначаються також окремі двоядерні ПК (рис. 3), які,

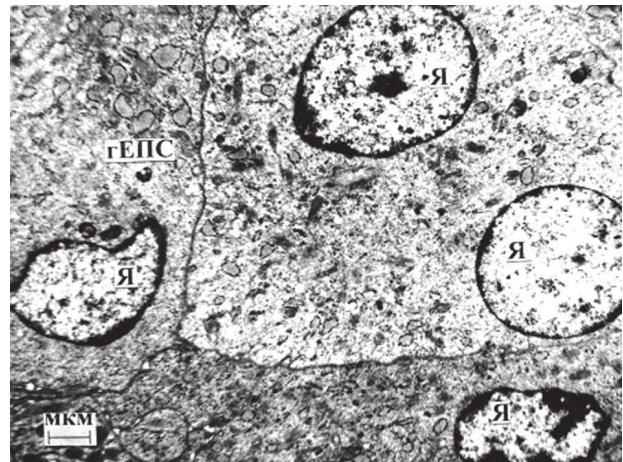
можливо, виникають внаслідок порушень процесів ділення. Показник мітотичної діяльності на цей термін повертається до контрольних значень. Клітини у стані апоптичної загибелі (рис. 4) трапляються частіш, індекс апоптозу помітно зростає. Слід зауважити, що при визначенні вірогідності за критерієм Стьюдента цей показник достовірно не відхиляється від норми, тоді як при застосуванні непараметричного критерію Рмп різниця є достовірною.

Таким чином, основною реакцією пухлини Герена на введення етопозиду є значуще зниження мітотичної активності через 6 год. після застосування та деяке підвищення індексу апоптозу. Вплив етопозиду на 1-шу добу проявляється у появі дрібних та двоядерних ПК, нормалізації процесів ділення та більш виразному рості апоптичного індексу.

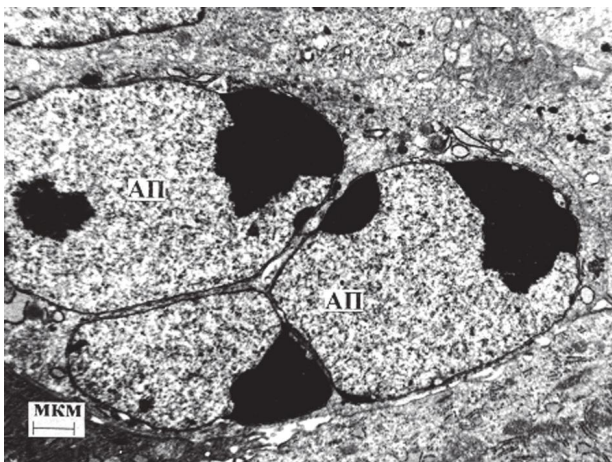
Через 6 год. після останньої фракції опромінення у пухлині Герена спостерігається помітний поліморфізм популяції її клітин. Типові ПК переважно мають світлі ядра часто неправильної форми, з інвагінаціями, які містять великі ядерця (рис. 5). Виявляється багато дво- та багатоядерних ПК (рис. 6), клітин з мікроядрами та плейоморфними ядрами (рис. 7). У цитоплазмі знижена кількість вільних рибосом та полісом,



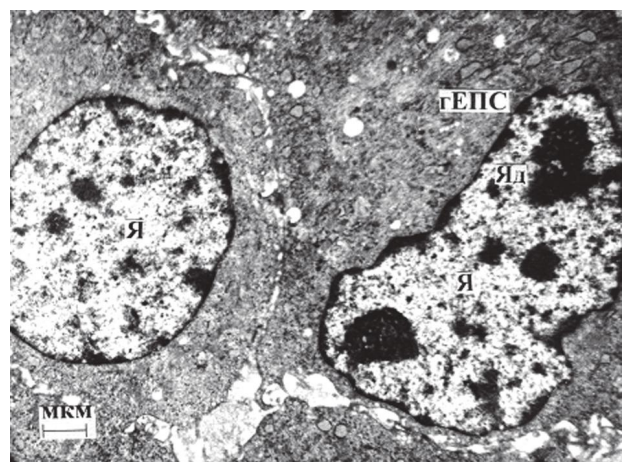
**Рис. 2.** Дрібні клітини карциноми Герена та пухлинна клітина з прозорими вакуолями через 24 год. після введення етопозиду. Вак — вакуолі



**Рис. 3.** Двоядерна клітина карциноми Герена через 24 год. після введення етопозиду



**Рис. 4.** Багатоядерна клітина карциноми Герена у стані апоптозу через 24 год. після введення етопозиду. АП — ядро у стані апоптозу



**Рис. 5.** Дві типові клітини карциноми Герена різної будови через 6 год. після опромінення



які беруть участь у синтезі білкових речовин для потреб самої клітини, зокрема росту та ділення, тоді як цистерни гЕПС, у якій виробляються та накопичуються білки, призначені до експорту, розширені та заповнені темною білковою субстанцією. На цей термін вірогідно гальмується мітотична активність, а процеси апоптозу значно активуються.

На 1-шу добу частина клітин карциноми Герена містять ядра майже нормального вигляду, вони світлі, мають гладкий або звивистий контур, містять 1–2 ядерця, але, як і у попередній термін, основним компонентом цитоплазми є розширені цистерни гЕПС (рис. 8). Іншу частину клітинної популяції складають ПК з різними ураженнями структури ядра: ПК, ядра яких мають покривний контур, глибокі інвагінації, інтрануклеарні включення; плейоморфні ядра та мікроядра; двоядерні клітини. При цьому стан цитоплазми цих клітин мало відрізняється від описаного для більшості ПК цієї серії. Вірогідно знижена мітотична активність пухлинних клітин. Індекс апоптозу підвищений і, хоча за критерієм Стюдента він вірогідно не відрізняється від контролю, при застосуванні непараметричного методу

(Рмп) встановлено, що в цій серії кількість тварин з підвищеним індексом апоптозу достовірно більша.

Отже, характерним для дії дрібнофракціонового тривалого опромінення в обидва терміни дослідження є значні ультраструктурні зміни клітин карциноми Герена, при яких відзначається ураження ядер: з'явлення великої кількості двоядерних клітин, плейоморфних ядер та мікроядер, а також зміна функції ПК з процесів ділення на білково-синтетичну діяльність. Саме ці процеси можуть лежати в основі стійкого вірогідного падіння мітотичної активності та активності апоптичної загибелі.

При сумісному застосуванні етопозиду та радіації через 6 год. після останньої фракції опромінення у частині клітин ядра зберігають ультраструктуру, притаманну інтактним ПК, тоді як у іншій — виявляються дво- та багатоядерні ПК, плейоморфні ядра та мікроядра, які можуть виявлятися навіть у ПК, що діляться (рис. 9). Основним компонентом цитоплазми усіх видів ПК є розширені профілі гЕПС, тоді як кількість вільних рибосом та мітохондрій невелика, трапляються ліпідні краплини та лізосоми. Подібна

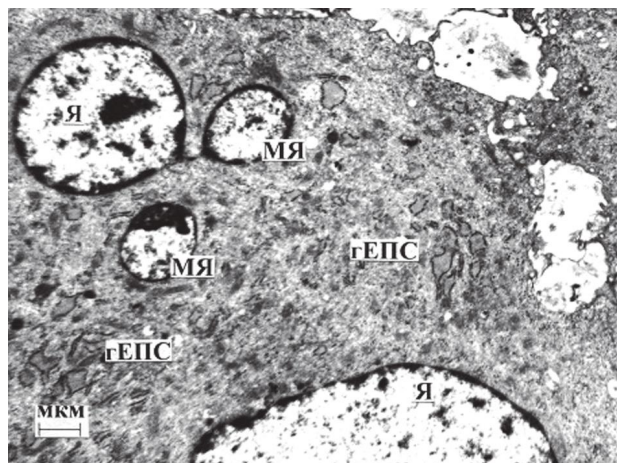


Рис. 6. Двоядерна клітина карциноми Герена з мікроядрами через 6 год. після опромінення. МЯ — мікроядро

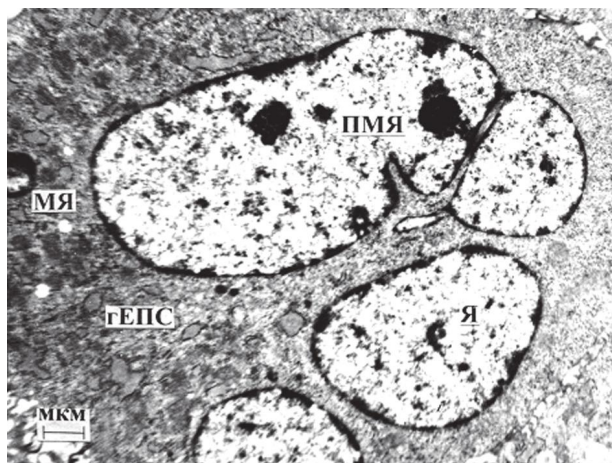


Рис. 7. Плейоморфне ядро та мікроядро у багатоядерній пухлинній клітині карциноми Герена через 24 год. після опромінення. ПМЯ — плейоморфне ядро

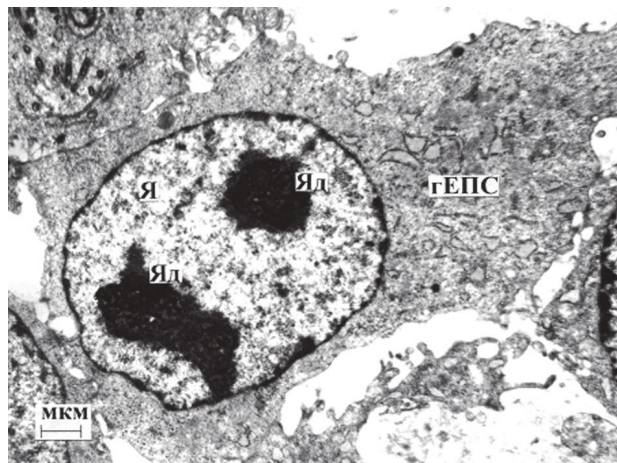


Рис. 8. Типова клітина карциноми Герена, яка містить світле ядро, з двома великими ядерцями та розширені цистерни гЕПС у цитоплазмі через 24 год. після опромінення

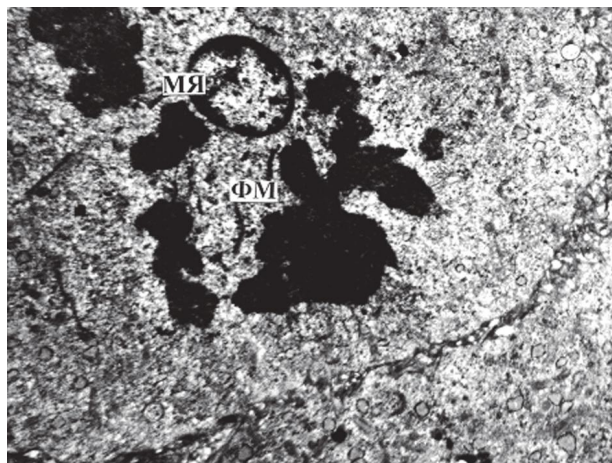
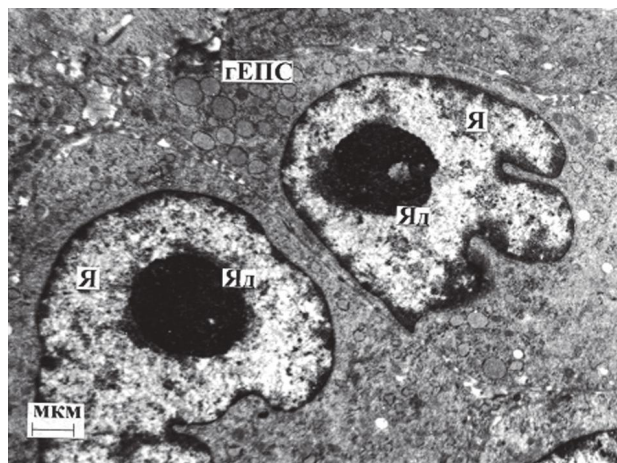


Рис. 9. Мікроядро та фігура мітозу в клітині карциноми Герена через 24 год. після сумісного застосування опромінення та етопозиду. ФМ — фігура мітозу

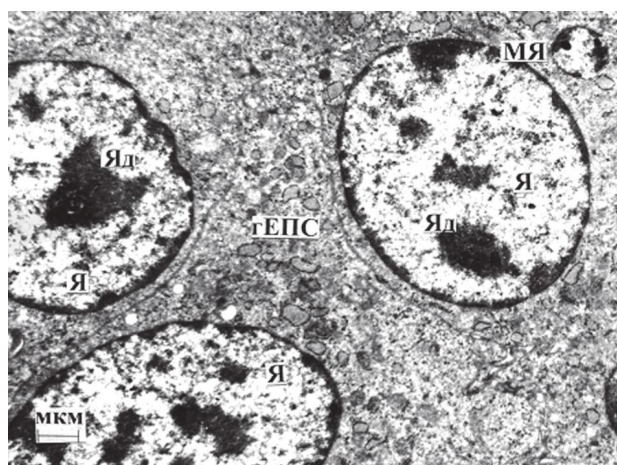


ультраструктура ПК характерна для пухлинної тканини і при одному тільки опроміненні і, очевидно, обумовлена його дією. Сумісне застосування опромінення та етопозиду через 6 год. приводить до різкого зниження мітогічного індексу, як у порівнянні з контролем, так і з впливом одного лише етопозиду, і може бути наслідком сумарного впливу обох факторів. Індекс апоптозу на цей термін вірогідно підвищується.

На 1-шу добу після опромінення у поєднанні з хіміопрепаратом ультраструктура ПК відповідає тій, яка спостерігалася у попередній термін. У пухлині реєструються дво- та багатоядерні клітини, плейоморфні ядра (рис. 10), мікроядра. Винятком може бути лише наявність дрібних ПК. Проте є клітини майже нормальної будови, які мають округлі ядра, з гладким контуром, диспергованим хроматином, чіткими ядерцями, звичайними цитоплазматичними органелами, але на відміну від інтактних вони невеликого розміру і містять мікроядра (рис. 11). На даний термін мітогічна діяльність вже повертається до вихідних показників, тоді як індекс апоптозу залишається вірогідно підвищеним, і ПК у такому стані можуть перебувати



**Рис. 10.** Невеликі плейоморфні клітини карциноми Герена з ядрами, які містять великі ядерця через 24 год. після сумісного застосування опромінення та етопозиду

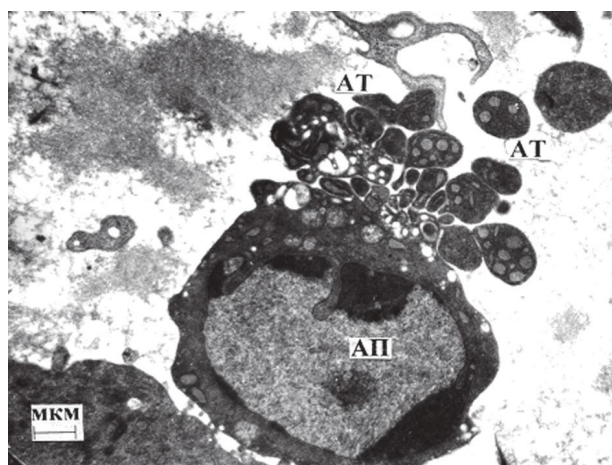


**Рис. 11.** Клітини карциноми Герена нормальної будови, але невеликого розміру, в одній з яких міститься мікроядро, через 24 год. після сумісного застосування опромінення та етопозиду

у різних фазах: від первинної, при якій зміни спостерігаються лише у ядрі, до тієї, коли відбувається фрагментація цитоплазми (рис. 12), і тих, де апоптичні ядра виявляються у некротичних клітинах.

Таким чином, після сумісної дії радіації та хіміопрепарату ПК мають ультраструктуру, обумовлену як дією радіації (порушення структури ядер, зростання кількості профілей гЕПС), так і введенням етопозиду (наявність дрібних клітин). Основною відмінністю можна вважати виразніший вплив сумісної дії обох факторів на процеси апоптозу, причому рівень апоптичного індексу достовірно підвищений в обидва терміни дослідження.

Проведене дослідження показало, що основним ефектом дії етопозиду на клітини карциноми Герена є короточасне (тільки на 6 год.) гальмування мітогічної активності з наступною появою (1 доба) у популяції дрібних ПК та незначна стимуляція апоптозу. Ультраструктура більшості ПК не змінюється. Для дрібнофракціонованого режиму опромінення в обидва терміни дослідження характерна наявність у пухлині Герена великої кількості дво- та багатоядерних ПК, клітин з мікроядрами та плейоморфними ядрами, що супроводжується пригніченням мітогічної діяльності та ультраструктурними змінами у цитоплазмі, які свідчать про інверсію функціональної діяльності ПК під впливом радіації. Саме ці процеси можуть лежати в основі стійкого вірогідного падіння мітогічної активності в обидва терміни дослідження, чого не відзначається при режимі великих фракцій [7]. Зростання індексу апоптозу, очевидно, відбувається внаслідок дії останньої фракції опромінення, про що свідчить динаміка його змін (максимум на 6 год., нормалізація — на 24 год.). При сумісному застосуванні опромінення та етопозиду ультраструктура карциноми Герена, очевидно, обумовлена дією обох факторів. Порушення у ядрах ПК є специфічними для опромінення, наявність дрібних клітин — для етопозиду, а триваліша вірогідна активація процесів апоптозу може відбуватися внаслідок дії як радіації, так і етопозиду.



**Рис. 12.** Клітина карциноми Герена у стані апоптозу з фрагментацією цитоплазми та відокремленням апоптозних тілець через 24 год. після сумісного застосування опромінення та етопозиду.  
АП — апоптозні тільця

При аналізі одержаних даних привертає увагу динаміка розвитку апоптозу при застосуванні хімічного та радіаційного факторів. Так, при введенні етопозиду ріст індексу АП (хоча і незначний) відбувається поступово з максимумом на 1-шу добу, тоді як при опроміненні на 6-ту годину спостерігається значний сплеск цього показника з наступним зниженням через 24 год. Можливо, це пов'язано з різними механізмами ініціації процесів апоптозу. Так, є дані [8], що введення етопозиду супроводжується різким ростом рівня керамідів у пухлині на 1-шу добу, тоді як опромінення має значно менший ефект. Тобто етопозид включає процес вироблення кераміду, при якому сфінгомієліназа гідролізує сфінгомієлін із його утворенням. У свою чергу керамід діє як вторинний месенджер, активуючи апоптоз через мітохондріальну систему (так званий керамідний шлях апоптозу). Такий шлях може бути тривалішим, тому стає зрозумілим максимум АП тільки через добу. Щодо опромінення, то відомо, що основною дією радіації є ураження ДНК, яке поряд із іншими механізмами загибелі клітин ініціює апоптоз, опосередкований включенням системи активації білка p53, відповідального за такі ланки усього ланцюжка реакцій, внаслідок чого відбувається специфічне порушення структури ядра та загибель клітин. Цей процес починається буквально з перших хвилин після опромінення і сягає свого максимуму через 4–6 год. [13]. Тобто, очевидно, етопозид індукує керамідний шлях апоптозу, а опромінення призводить

до стимуляції апоптозу шляхом включення системи p53, тобто значно виразніше зростання апоптозної загибелі ПК при сумісній дії радіації та етопозиду може відбуватися за рахунок сумачії ефектів обох чинників.

## ВИСНОВКИ

1. Основною дією етопозиду на клітини карциноми Герена є короточасне гальмування процесів ділення у ранній термін після введення з наступним поновленням через 24 год., що супроводжується появою дрібних ПК на 1 добу. Етопозид майже не впливає на ультраструктуру більшості ПК і є слабким індуктором апоптозу у пухлині Герена.

2. Дрібнофракціоноване тривале опромінення викликає значні ультраструктурні зміни у клітинах карциноми Герена, які свідчать про радіаційне ураження ядер, та інверсію функції пухлинних клітин з росту та ділення до білково-синтетичної діяльності. Вірогідне гальмування мітотичної активності в обидва терміни дослідження може бути наслідком цих процесів. Короточасне зростання індексу апоптозу лише на 6-ту год. викликано, очевидно, дією останньої фракції опромінення.

3. При сумісному застосуванні радіації та етопозиду виразні зміни ультраструктури пухлинних клітин обумовлені опроміненням; наявність дрібних ПК — впливом хіміопрепарату, а у тривале зниження мітотичної активності та активацію процесів апоптозу свій внесок роблять обидва чинники.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дьоміна Е. А. Радіаційна резистентність пухлин: причини та механізми / Е. А. Дьоміна, В. С. Іванкова // Укр. радіол. журн. — 2012. — Т. XX, вип. 2. — С. 151–153.
2. Сивашинский М. С. Некоторые пути повышения эффективности химиотерапии больных с диссеминированными солидными опухолями / М. С. Сивашинский // Вопр. онкол. — 2004. — № 2. — С. 56–63.
3. Fluda S. Tumor resistance to apoptosis / S. Fluda // Int. J. Cancer. — 2009. — Vol. 124. — P. 511–515.
4. Іванкова В. С. Можливі перспективи розвитку радіаційної онкології / В. С. Іванкова, Е. А. Дьоміна // Укр. радіол. журн. — 2012. — Т. XX, вип. 2. — С. 157–159.
5. Лукашова О. П. Морфологічний стан клітин карциноми Герена після фракційного рентгенівського опромінення та сумісної дії кріо- та радіаційного факторів / О. П. Лукашова, О. А. Міхановський // Укр. радіол. журн. — 2007. — Т. XV, вип. 3. — С. 344–351.
6. Лукашова О. П. Ультраструктура клітин карциноми Герена після застосування хемопрепаратів і локального опромінення пухлині / О. П. Лукашова, Н. А. Мітряєва, С. М. Пушкар // Укр. радіол. журн. — 2007. — Т. XV, вип. 3. — С. 352–357.
7. Лукашова О. П. Дія іонізуючої радіації та препарату «Етопозид» на процеси апоптозу та ультраструктуру клітин карциноми Герена / О. П. Лукашова // Укр. радіол. журн. — 2013. — Т. XXI, вип. 1. — С. 56–63.
8. Сегеда Т. В. Синергізм дії іонізуючої радіації та протипухлинних препаратів на вміст кераміду в пухлині Герена / Т. В. Сегеда // Укр. радіол. журн. — 2013. — Т. XXI, вип. 4. — С. 409–413.
9. Сегеда Т. В. Вплив поєднаної дії іонізуючого випромінювання та етопозиду на сфінгомієліновий цикл у сироватці крові щурів-пухлиноносців / Т. В. Сегеда, Н. А. Мітряєва, Т. С. Бакай, Л. В. Гребіник, Н. А. Бабенко // Укр. радіол. журн. — 2013. — Т. XXI, вип. 1. — С. 64–68.
10. Harris J. R. Electron Microscopy in Biology. A Practical Approach. / ed. by J. R. Harris. — Oxford University Press, 1991. — 308 p.
11. Сусликов В. И. Максимально правдоподобная оценка достоверности различия между результатами наблюдения, когда ожидаемое количество особей с наличием эффекта или его отсутствием в одной (или нескольких) группе (группах) меньше пяти / В. И. Сусликов // Тез. докл. 2-й Всесоюзной конф. по фармакологии противолучевых препаратов, 20–24 ноября 1972 г. — Москва, Институт биофизики МЗ СССР. — М., 1972. — С. 38.
12. Олійниченко П. И. Справочник по полихимиотерапии опухолей / П. И. Олійниченко, З. П. Булкина, Т. И. Синиборова. — Київ : Здоров'я, 2000. — 294 с.
13. Kolesnic R. Radiation and ceramide-induced apoptosis / R. Kolesnic, Z. Fuks // Oncogene. — 2003. — N 22. — P. 5897–5906.

Стаття надійшла до редакції 18.09.2015.

О. П. ЛУКАШОВА

ГУ «Институт медицинской радиологии им. С. П. Григорьева НАМН Украины», Харьков

### ВЛИЯНИЕ МЕЛКОФРАКЦИОНИРОВАННОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ В СУММАРНОЙ ДОЗЕ 10 ГР И ЭТОПОЗИДА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА

**Цель работы.** Электронномикроскопическое изучение ультраструктуры клеток карциномы Герена и процессов развития апоптоза после введения препарата «Этопозид» и локального рентгеновского облучения опухоли в суммарной дозе 10 Гр при использовании разовых фракций 2 Гр.

**Материалы и методы.** С помощью стандартных методов электронной микроскопии исследована ультраструктура (УС) опухолевых клеток (ОК) и подсчитаны индексы митоза и апоптоза (АП) через 6 и 24 часа после локального рентгеновского облучения карциномы Герена в суммарной дозе 10 Гр (5 фракций по 2 Гр ежедневно) и введения химиопрепарата «Этопозид» в дозе 8 мг/кг за 18 часов до последней фракции облучения.

**Результаты.** Установлено, что введение этопозиды приводит к достоверному снижению митотического индекса в опухоли через 6 ч, появлению мелких опухолевых клеток, незначительным изменениям индекса АП. Характерным для действия радиации является появление в опухоли дву- и многоядерных клеток, а также присутствие в ОК плеоморфных ядер и микроядер. В цитоплазме уменьшается количество свободных рибосом и полисом и возрастает число профилей шероховатой эндоплазматической сетки. Достоверно падает уровень митотического индекса, а индекс АП возрастает с максимумом на 6-ой час. При совместном действии радиации и этопозиды УС клеток карциномы Герена подобна наблюдаемой при одном облучении, к чему присоединяется наличие мелких ОК. В оба срока отмечается значимое падение уровня митотического индекса и достоверный рост индекса АП.

**Выводы.** Основным действием этопозиды на клетки карциномы Герена является кратковременное торможение процессов деления в ранний срок после введения с последующим восстановлением через 24 часа, что сопровождается появлением мелких ОК на 1-е сутки. Этопозид мало влияет на УС большинства ОК и является слабым индуктором АП в опухоли Герена. Мелкофракционированное облучение вызывает значительные УС-изменения в клетках карциномы Герена, которые свидетельствуют о радиационном поражении ядер, а также об инверсии функции ОК с роста и деления на белково-синтетическую деятельность, а достоверное снижение митотической активности в оба срока наблюдения может быть причиной этих процессов. Кратковременное увеличение индекса апоптоза лишь через 6 часов вызывается, очевидно, действием последней фракции облучения. При совместном применении радиации и этопозиды выраженные изменения УС ОК обусловлены облучением, наличие мелких ОК — влиянием препарата, а в снижение митотической активности и активации АП свой вклад вносят оба фактора.

**Ключевые слова:** радиация, этопозид, карцинома Герена, ультраструктура, апоптоз.

O. P. LUKASHOVA

SI «Grigoriev Institute for Medical Radiology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv

### INFLUENCE OF FINELY FRACTIONAL X-RAY RADIATION IN THE TOTAL DOSE OF 10 GY AND ETOPOSIDE CHEMOTHERAPEUTIC AGENT ON ULTRASTRUCTURE OF HEREN CARCINOMA CELL

**Purpose.** Electron-microscopic study of structural and functional state of Heren carcinoma cell and processes of apoptosis development after administration of Etoposide and local X-ray radiation in the total dose of 10 Gy using 2 Gy single fractions.

**Methods.** Due to standard methods of electron microscopy ultrastructure of tumor cells has been studied as well as mitosis and apoptosis indices in 6 and 24 hours after local X-ray radiation of Heren carcinoma in the total dose of 10 Gy (5 fractions/2 Gy daily) and administration of Etoposide chemotherapeutic agent in the dose of 8 mg/kg 18 hours before the final radiation fraction have been estimated.

**Findings.** It has been established that Etoposide after administration leads to significant reduction of mitosis index in the tumor in 6 hours, appearance of small tumor cells for one day long, inconsiderable changes of apoptosis index. Presence of binuclear and polynuclear cells in the tumor along with pleiomorphic nuclei and micronuclei in the tumors cells is peculiar to radiation action. The cytoplasm is characterized by decreased amount of free ribosomes and polysomes; the number of profiles of granular endoplasmic reticula tends to increase. Significant reduction of mitosis index is observed when apoptosis index rises to the maximum during the sixth hour. In case of combined action of radiation and Etoposide, the ultrastructure of Heren carcinoma cells is similar to the one which is observed if one radiation is carried out together with presence of small tumor cells. Both periods are characterized by considerable reduction of mitosis index level and significant increase of apoptosis index.

**Conclusions.** The main effect of Etoposide on Heren carcinoma cell consists in short-term antimitosis at the early stage after administration with the subsequent one in 24 hours that is accompanied by appearance of small tumor cells for 1 day long. Etoposide scarcely influences ultrastructure of most tumor cells and is considered to be a weak



inducer of apoptosis in Heren tumor. Long-term finely fractional radiation results in significant ultrastructural changes in Heren carcinoma cells that suggest radiation injury of nuclei and inversion of tumor cells function from growth and division to protein-synthetic activity. Significant antimitosis in both periods of the study can result from these processes. Short-term increase of apoptosis index during the 6 hour is obviously caused by action of the final radiation fraction. In case of combined use of radiation and Etoposide, indicative changes of tumor cells ultrastructure are caused by radiation, presence of small tumor cells results from chemotherapeutic agent effect and reduction of mitotic activity and activation of apoptosis processes are induced by both factors. Different ways of development such as mediated p53 and ceramide apoptosis way can participate in mechanisms of induction of apoptosis in action of radiation and Etoposide.

**Keywords:** radiation, Etoposide, Heren carcinoma, ultrastructure, apoptosis.

**Контактна інформація:**

Лукашова Ольга Петрівна

канд. біол. н., керівник групи електронної мікроскопії ДУ ІМР НАМН України

вул. Пушкінська, 82, м. Харків, 61024, Україна

тел.: +38 (050) 780-63-90