

На правах рукописи

Фомина Наталья Константиновна

**ДЕЙСТВИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ И
ПЕПТИДНОГО БИОРЕГУЛЯТОРА ЭПИТАЛОНА НА
КИНЕТИКУ РОСТА И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ
МОРФОЛОГИЮ САРКОМЫ М-1**

03.00.01 - радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Обнинск – 2007

Работа выполнена в лаборатории радиационной патоморфологии ГУ - Медицинский радиологический научный центр Российской академии медицинских наук

Научный руководитель: кандидат медицинских наук
Южаков Вадим Васильевич

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук
Курпешев Оразахмет Керимбаевич

доктор биологических наук
Спирин Евгений Викторович

Ведущая организация: ГУ – Российский онкологический научный центр
им. Н.Н. Блохина РАМН

Защита состоится 25 сентября 2007 г. в 11⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 001.011.01 в ГУ - Медицинский радиологический научный центр РАМН (249036, г. Обнинск, ул. Королева, д. 4)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ - Медицинский радиологический научный центр РАМН.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Палыга Г.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одной из актуальных задач современной радиобиологии и онкологии является поиск оптимальных методов лечения злокачественных новообразований, оценка эффективности их действия и изучение механизмов индивидуальной чувствительности опухолей к лечебным воздействиям.

До настоящего времени одним из основных способов лечения в онкологии остается лучевая терапия. Главной задачей лучевой терапии является уничтожение максимального числа опухолевых клеток при наименьшем поражении окружающих нормальных тканей [Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А., 2004]. Несмотря на совершенствование методов лучевой терапии и достижения в области онкологической радиобиологии, прогнозировать реакцию опухолей на радиационное воздействие достаточно сложно. Особое внимание уделяется возможностям применения в лучевой терапии радиомодифицирующих веществ, способных повышать эффективность радиационного воздействия на злокачественные опухоли до, во время и после облучения.

Одним из перспективных современных направлений является биотерапия опухолей с применением регуляторных пептидов [Анисимов В.Н., Хавинсон В.Х., 1993; Хавинсон В.Х., Анисимов В.Н., 2003]. Ранее полученные нами данные об ингибирующем действии синтетического биорегулятора эпиталона на пролиферативную активность клеток свидетельствуют о целесообразности испытания этого пептида в качестве потенциального противоопухолевого препарата [Хавинсон В.Х. и др., 2001].

Благодаря открытиям в области клеточной и молекулярной биологии злокачественного роста появилась возможность применения в радиобиологических исследованиях различных маркеров, отражающих пролиферативную активность, функциональное состояние и гибель опухолевых клеток. Применение этих чувствительных методов требует стандартизации количественной оценки морфофункциональных показателей для анализа кинетических параметров ответа новообразований на облучение при разработке схем лучевой и комбинированной терапии на экспериментальных моделях опухолевого роста.

В последние годы важный аргументированный блок для описания биологических явлений на количественном уровне, являющийся необходимой предпосылкой для математических моделей динамических структур и процессов в клетке, обеспечивает компьютерный анализ изображений.

Цель и задачи исследования

Целью данного диссертационного исследования является изучение структурно-функциональных особенностей экспериментальной опухоли саркомы М-1 при радиационном повреждении и введении синтетического пептида – эпиталона с использованием компьютерного анализа микроскопических изображений.

В соответствии с указанной целью были сформулированы и последовательно решены следующие задачи:

1. Изучить параметры кинетики роста саркомы М-1 на фоне действия гамма-облучения, при введении эпиталона и при их сочетанном воздействии.
2. Исследовать основные закономерности действия гамма-излучения и эпиталона на морфо-функциональные характеристики саркомы М-1.
3. По критериям пролиферативной активности и индуцированной гибели опухолевых клеток оценить возможность применения эпиталона в комплексных методах терапии злокачественных новообразований.

Научная новизна работы

Впервые по материалам морфо-функциональных исследований, основанных на применении высокочувствительных методов гистохимии, иммуногистохимии и морфометрии, создана количественная база данных для быстрорастущей соединительно-тканной опухоли саркомы М-1.

На основе данных компьютерного анализа в периферической зоне, определяющей рост опухолей, рассчитана фракция пролиферирующих клеток по индексу PCNA и уровень спонтанной гибели по индексу апоптоза, а также изучены параметры пролиферативной активности и индуцированной гибели опухолевых клеток при действии ионизирующего излучения, синтетического пептида – эпиталона и их сочетанном применении.

Установлено, что пептидный биорегулятор «эпиталон» замедляет рост саркомы М-1, а морфологическим эквивалентом ингибирующего действия препарата является развитие некроза опухолей и усиление апоптотической гибели опухолевых клеток. Согласно результатам проведенных исследований, по механизму действия, эпиталон можно отнести к классу модификаторов биологических реакций, а его основной эффект, по-видимому, реализуется через сосудистое русло опухолей.

Практическая значимость работы

Полученные результаты позволили выяснить особенности действия ионизирующего излучения и пептидного препарата на радиорезистентную опухоль саркомы М-1. Эти сведения свидетельствуют о противоопухолевой активности эпиталона, что открывает возможность его применения в комплексных методах противоопухолевой терапии.

Метод количественной оценки морфо-функциональных параметров экспериментальной опухоли саркомы М-1 показал принципиальную возможность его использования в комплексном исследовании радиорезистентных опухолей для объективизации диагностики и разработки критериев прогноза. Новые данные о действии гамма-излучения и пептидного биомодулятора на клеточное микроокружение, пролиферативную активность и апоптоз клеток саркомы М-1 могут быть использованы как базовые для дальнейших экспериментальных исследований.

Результаты исследований показали, что автоматизированные методы компьютерного анализа изображений позволяют стандартизировать количественную оценку экспрессии маркеров, используемых в онкорadiобиологии, и расширяют возможность получения объективных данных, необходимых для оценки дисбаланса между процессами пролиферации и индуцированной гибели при разработке схем лучевой и комбинированной терапии на экспериментальных моделях опухолевого роста.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Компьютерный анализ микроскопических изображений позволил установить основные закономерности действия гамма-облучения и синтетического пептида «эпиталона» на функциональную морфологию саркомы М-1.

2. Радиационно-индуцированный апоптоз является важным фактором, который обеспечивает результативность действия гамма-облучения на радиорезистентную форму экспериментальной опухоли – саркому М-1.

3. Пептид «эпиталон» достоверно замедляет рост саркомы М-1. Вместе с тем, на фоне деструктивных изменений в паренхиме опухолей, вызванных гамма-облучением, значимый аддитивный онкомодифицирующий эффект эпиталона не регистрируется.

Апробация и реализация результатов исследования

Основные результаты и положения диссертационной работы доложены и обсуждены на: V Всероссийском съезде онкологов (Казань, 2000); IV съезде по радиационным исследованиям (Москва, 2001); международной междисциплинарной конференции «Новые биокрибернетические и телемедицинские технологии 21 века для диагностики и лечения заболеваний человека» («НБИТТ-21») (Петрозаводск, 2002); Международном экологическом форуме «Окружающая среда и человек» (Санкт-Петербург, 2003); Всероссийской конференции «Радиобиологические основы лучевой терапии» (Москва, 2005). Результаты диссертации используются в научно-практической работе ГУ МРНЦ РАМН.

Диссертация апробирована на научной конференции экспериментального радиологического сектора ГУ МРНЦ РАМН 7.03.2007 г. (протокол № 223).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка литературы. Текст диссертации изложен на 162 страницах, включающих 47 рисунков и 2 таблицы. Список литературы содержит 281 источник, из них отечественных —96, зарубежных — 185.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Работа выполнена на 90 самцах белых беспородных крыс в возрасте 3-х мес, имеющих массу тела 180 - 200 г. В качестве объекта исследования использовали перевиваемый штамм саркомы М-1. На 11 сут после перевивки 60 животных с опухолевыми узлами правильной формы были распределены на 4 группы по 15 крыс: 1 - контроль; 2 - γ -облучение опухолей в дозе 30 Гр; 3 - введение эпиталона; 4 - γ -облучение опухолей в дозе 30 Гр + введение эпиталона. Животные с «нестандартными» опухолями были дополнительно включены в 1 и 2 группы для изучения особенностей гистоархитектоники саркомы М-1 в экспоненциальной фазе роста и определения степени лучевой инактивации опухолевых клеток через 3 ч, 1 и 3 сут после γ -облучения.

Размеры опухолей определяли 2-3 раза в неделю и рассчитывали их объем по формуле эллипсоида. Коэффициент роста опухолей определяли по формуле $KPO = (Vt_{35} - Vt_{16})/Vt_{16}$, где Vt_{35} и Vt_{16} – объемы опухолей на 35 и 16 сут после имплантации.

Местное однократное γ -облучение опухолей животных 2-й и 4-й групп выполнено на кобальтовой установке «Луч» при мощности дозы 0,8 Гр/мин. Облучение проведено на 16 сут роста опухолей. Острые ЛРК над опухолью оценивали на 10 сут после γ -облучения по упрощенной системе баллов. На 18 сут роста саркомы животным 3-й и 4-й групп начали вводить эпиталон. К этому сроку средний объем опухолей в контрольной группе достиг 1 см³. Препарат вводили внутривентриально по 0,5 мкг на животное семь дней подряд.

По динамике и дивергенции линий роста опухолей в испытуемых группах был определен срок для гистологического изучения саркомы. На 26 сут роста опухолей (10 сут после γ -облучения во 2-й и 4-й группах; 2 сут после окончания введения эпиталона в 3-й и 4-й группах) в каждой группе было отобрано по 5 крыс. Выведение животных из опыта и выделение опухолей проведено под нембуталовым наркозом (50 мг/кг). Кусочки опухолей фиксировали 24 ч кислой жидкостью Буэна для светомикроскопических исследований и по Карновскому для электронной микроскопии. Обезвоженный материал заливали, соответственно, в парапласт и эпон.

Микротомные срезы толщиной 7 мкм помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma). Общую гистологию саркомы изучали на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином и по Ван-Гизон. Тучные клетки селективно окрашивали 1% раствором толуидинового синего (Fluka) в 0,5 М HCl при pH 0,5 [Enerback L. et al., 1986]. Ультроструктурные исследования проводили в электронном микроскопе JEM-100S (JEOL) на ультратонких срезах, контрастированных уранилацетатом и цитратом свинца. Тип клеток идентифицировали способом серийных полутонких - ультратонких срезов. Полутонкие срезы окрашивали по методу Humphrey, Pittman (1974).

Иммуногистохимические исследования проводили с использованием мышинных моноклональных антител к PCNA (1:50, Calbiochem), серотонину (1:15, DAKO) и АБП набора для выявления мышинных иммуноглобулинов (Vectastain). Адгезионную связь клеток саркомы с базальной мембраной эндотелия сосудов и их способность к локальной инвазии изучали с помощью кроличьих антител к ламинину и БСП комплекса для кроличьих иммуноглобулинов (Sigma). Для изучения перифокального иммунного ответа применяли набор для выявления крысиных иммуноглобулинов (BioGenex).

Функциональную активность опухолевых клеток изучали методом импрегнации ядрышковых организаторов в модификации [Мамаев Н.Н. и др., 1984]. Апоптотические клетки визуализировали на препаратах, импрегнированных по методу Мозера [Moser В. А., 1995].

Морфометрические исследования выполнены с помощью системы компьютерного анализа микроскопических изображений IMSTAR (Франция) с применением прикладных компьютерных лицензионных программ Morphostar-2 и Colquant-2. Для каждого животного подсчет соответствующих структур проводили в 10-20 визуальных тестовых полях по трем срезам каждой исследуемой опухоли. A_T для ядер опухолевых клеток и определения индекса PCNA составляла $0,5 \text{ мм}^2$ и включала не менее 2000 опухолевых клеток в препаратах контрольной группы. A_T для AgNOR = $0,3 \text{ мм}^2$ и включала не менее 1000 ядрышковых организаторов. Индекс апоптоза и митотический индекс подсчитывали в 60 полях при иммерсионном увеличении микроскопа. Общая тестируемая площадь включала не менее 1000 ядер опухолевых клеток.

Параметры роста опухолей определяли по 10 животным. В 1-й и 3-й группах опухоли измеряли до гибели всех крыс; во 2-й и 4-й – на протяжении 8 недель. Для изучения скорости прироста опухолей за определенный период времени вычисляли среднюю геометрическую $G_{(t_1-t_n)} = \sqrt[n]{V(t_1) * V(t_2) * \dots * V(t_n)}$ в интервале времени t_1-t_n . Скорость роста опухолей определяли по коэффициенту α из уравнений линий тренда $V_t = V_0 + \alpha t$.

Для статистической обработки полученных результатов использовали t-тест Стьюдента для малых выборок и непараметрический U-критерий Манн-Уитни.

Результаты исследования и обсуждение

По нашим данным, для саркомы М-1 характерна выраженная зональная неоднородность количественной плотности опухолевых клеток, их пролиферативной активности по PCNA и апоптотической гибели. Так, в участках солидного строения содержание апоптотических структур заметно выше, а интенсивность иммуноокрашивания ядер клеток саркомы на PCNA почти на 20% ниже по сравнению с опухолевыми клетками, которые располагаются в зоне роста новообразований и группируются вокруг отдельных сосудов. По-видимому, апоптотическая гибель клеток саркомы М-1 и синтез

ядерного антигена пролиферирующих клеток достаточно чувствительны к концентрации поступающего в клетки кислорода, т.е. к гипоксии.

В связи с выраженным полиморфизмом гистоструктуры исследуемого штамма опухоли, нами были определены унифицированные критерии выбора тестовых полей для сравнительного анализа изучаемых параметров в подопытных группах, что, на наш взгляд, позволило добиться максимальной стандартизации полученных результатов (табл. 1).

Таблица 1.

Количественные характеристики исследованных параметров саркомы М-1 в контрольных и подопытных группах.

Группы и срок исследования	$N_{\text{ок}} / \text{мм}^2$	$I_{\text{PCNA}} (\%)$	$I_{\text{МИТ}} (\%)$	$I_{\text{АПОПТ}} (\%)$	$S_{\text{яо}} \text{ мкм}^2$	$\rho_{\text{яо}} (\%)$
1-я (контроль); 16-18-е сут; n=3	4117±125	81,0±5,9	2,30±0,21	0,29±0,08	2,69±0,09	7,59±0,21
1-я (контроль); 26-е сут; n=5	4220±80	76,5±2,6	2,28±0,09	0,28±0,03	2,70±0,08	7,40±0,18
2-я (γ-облучение); 3 ч; n=3	4020±96	68,0±1,5	0,55±0,10	2,29±0,20 $p_{2,1} < 0,05$	2,75±0,07	6,02±0,20
2-я (γ-облучение); 1-е сут; n=3	3503±154 $p_{2,1} < 0,05$	69,3±3,0	(-)	1,97±0,24 $p_{2,1} < 0,05$	3,21±0,05	5,63±0,19
2-я (γ-облучение); 3-и сут; n=3	1993±147 $p_{2,1} < 0,05$	85,7±3,0	(-)	1,93±0,15 $p_{2,1} < 0,05$	3,29±0,04 $p_{2,1} < 0,05$	5,61±0,21
2-я (γ-облучение); 10-е сут; n=5	3560±205 $p_{2,1} < 0,05$	62,3±3,9 $p_{2,1} < 0,05$	2,31±0,06	1,50±0,18 $p_{2,1} < 0,01$	3,10±0,02 $p_{2,1} < 0,05$	5,90±0,14 $p_{2,1} < 0,01$
3-я (действие эпиталона); n=5	4230±120	74,5±2,7	1,89±0,11	0,67±0,13 $p_{3,1} < 0,05$	2,80±0,03	7,38±0,17
4-я (γ-облучение + эпиталон); n=5	3320±190 $p_{4,2} > 0,05$	61,1±3,8	2,07±1,16 $p_{4,2} > 0,05$	1,30±0,12 $p_{4,2} > 0,05$	2,98±0,10 $p_{4,2} > 0,05$	5,10±0,20 $p_{4,2} > 0,05$

(-) – большая часть митозов представлена патологическими формами

В конце экспоненциальной фазы роста саркомы М-1 в периферической зоне паренхимы, определяющей рост опухолей, плотность опухолевых клеток составляет 4200 ± 80 на 1 мм^2 , митотический индекс опухолевых клеток определен в $2,28 \pm 0,09\%$, а индекс апоптоза почти на порядок ниже – $0,28 \pm$

0,03%. По индексу соотношения ($I_c = 8,2$) митотическая активность опухолевых клеток в 8 раз выше, чем их гибель путем апоптоза.

По существующим представлениям основные закономерности скорости роста определяются балансом размножения, гибели и элиминации опухолевых клеток [Райхлин Н.Т. и др., 1996]. Согласно современным представлениям идеальными маркерами пролиферации являются белки, постоянно присутствующие в клетке во всех фазах митотического цикла и быстро исчезающие при его завершении. Поэтому в настоящее время для оценки пролиферативного статуса опухолевых клеток применяют иммуногистохимическое выявление ядерных белков (циклинов), принимающих участие в подготовке клеточного деления [Iatropoulos M.J., Williams G.M., 1996]. При изучении клинического материала с этой целью наиболее часто применяется антиген Ki-67 [Пожарисский К.М. и др., 2005]. В экспериментальных исследованиях широкое распространение получил PCNA [Южаков В.В. и др., 2005; Conolly K.M., Bogdanffy M.S., 1993]. Этот дополнительный белок к δ и ϵ полимеразам ДНК появляется в ядрах делящихся клеток в середине G_1 периода, максимальная экспрессия происходит в S фазе и постепенно снижается к концу периода G_2 . Фактически, иммунолокализация этого циклина позволяет выявить всю фракцию пролиферирующих клеток. Полученные нами данные показали, что в саркоме M-1 фракция пролиферирующих клеток по индексу PCNA составляет $76,5 \pm 2,6\%$.

Следует полагать, что при интегральной оценке степени прогрессии злокачественных новообразований учет фактора «потери» клеток является не менее важным, чем их способность к размножению. Для опухолей основными факторами «потери» являются некроз и апоптоз. Полученные нами данные по митотическому и апоптотическому индексам отличаются от результатов других авторов [Абросимов А.Ю., Скоропад В.Ю., 1991]. Вариабельность этих показателей объясняется принципиально иным методологическим подходом, выбранным нами для изучения функциональной морфологии этой опухоли, и унифицированной системой подсчета клеток.

По-видимому, для саркомы M-1, широко используемой в радиобиологических исследованиях, достаточно большое значение имеют и другие полученные нами результаты. Так, несмотря на выраженный экспансивный характер роста саркомы M-1, признаков инвазии в сосуды и прорастания опухолевыми клетками соединительнотканной капсулы мы не обнаружили, что свидетельствует о невысокой склонности этого штамма к метастазированию. Кроме того, отсутствие выраженной перифокальной воспалительной и иммунной реакции предполагает, что клетки саркомы M-1 обладают, по-видимому, высокой толерантностью к защитным иммунным реакциям организма.

В целом, наши результаты показали, что саркома M-1 представляет низкодифференцированную соединительнотканную опухоль с высоким

пролиферативным потенциалом и низким уровнем спонтанного апоптоза. Судя по зонам ядрышковых организаторов, высокая функциональная активность опухолевых клеток направлена на интенсификацию процессов размножения.

По существующим представлениям в интерфазных ядрах зоны ядрышковых организаторов представляют участки активной транскрипции рРНК [Morales A. et al., 1996]. В последние годы метод AgNOR для изучения зон ЯО предлагают применять для прогностической оценки эффективности предоперационной радиотерапии опухолей [Kinoshita Y. et al., 1996]. Многие исследователи ограничиваются определением лишь количества ядрышковых организаторов в ядре, производя подсчет среднего числа гранул серебра на одно ядро. Однако есть данные и об измерении площади зон ядрышковых организаторов с использованием систем компьютерного анализа [Турбин Д.А., Перевошиков А.Г., 1998]. Нами был введен дополнительный интегральный показатель, отражающий процентное содержание области ЯО в ядре. Так, в контроле в клетках саркомы М-1 средняя площадь одной зоны ЯО составила $2,7 \pm 0,08$ мкм²; при интегральном содержании в ядре – $7,4 \pm 0,18\%$.

Сравнительная оценка роста опухолей в группе контрольных животных и после гамма-облучения в дозе 30 Гр (рис. 1,а) показала, что в течение первой недели после облучения наблюдается довольно быстрая частичная регрессия опухолей с последующим также достаточно быстрым увеличением их объемов в течение 2 - 4 сут. Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым ускоренная репопуляция новообразований в первое время после ремиссии или регрессии объясняется двумя моментами: увеличением пролиферативного пула опухолевых клеток в связи с реоксигенацией и в ряде случаев - снижением продолжительности клеточного цикла [Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А., 2004]. По-видимому, определенную роль в быстром увеличении размеров опухолей играет и отек в зоне облучения. Именно в этот период в зоне радиационного воздействия начинает формироваться картина лучевого дерматита.

Наши результаты изучения опухолей в ранние сроки после гамма-излучения показали, что индуцированная ионизирующей радиацией гибель опухолевых клеток идет по «стандартной схеме», однако лучевая инактивация саркомы М-1 достаточно низкая. Так, однократное гамма-облучение в дозе 30 Гр привело лишь к частичной регрессии и последующему быстрому возобновлению роста опухолей при полном восстановлении их объемов к 10 сут после облучения. К 3 сут после облучения количественная плотность морфологически жизнеспособных опухолевых клеток в тестовой зоне снизилась только в 2 раза (табл. 1). При этом пролиферативная активность клеток, избежавших лучевой инактивации, сохранилась очень высокой (I_{PCNA} составил 85,7%). Объяснить достаточно низкий уровень лучевой инактивации саркомы М-1, по-видимому, можно исходя из того, что значительную часть опухолевой популяции в этом опухолевом штамме составляют гипоксические

клетки. Активизация в этот период зон ЯО свидетельствует о направленности биосинтетических процессов на репарацию поврежденных структур выживших опухолевых клеток. Усиление пролиферативной активности клеток на 3 сут после облучения, возможно, обусловлено эффектами реоксигенации - распределением кислорода среди меньшего числа клеток и увеличением доступа кислорода к ранее гипоксическим клеткам.

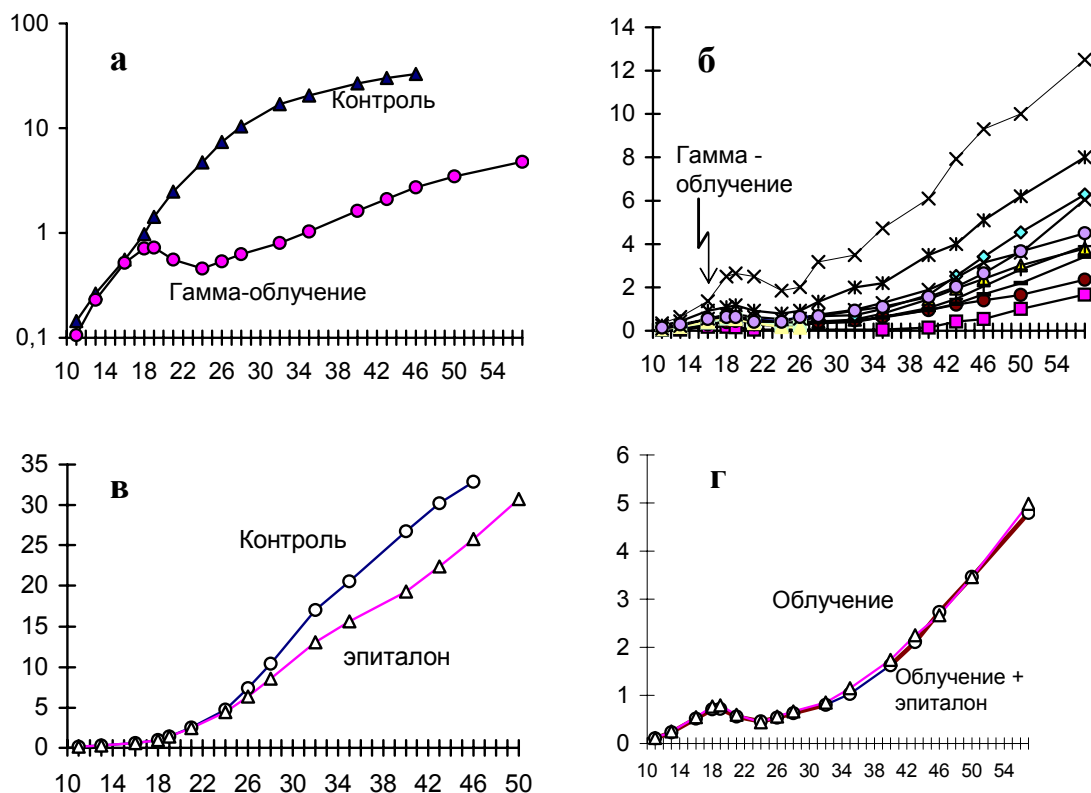


Рис. 1. Рост саркомы М-1 в контрольной и подопытных группах.

По оси абсцисс – срок после имплантации опухолей, сут; по оси ординат – объем опухолей, см³. **а** – рост опухолей в контроле и после облучения в координатах логарифмической шкалы; **б** – индивидуальная реакция опухолей на гамма-облучение в дозе 30 Гр; **в** – рост опухолей в контроле и после введения эпиталона; **г** – рост саркомы М-1 после облучения и сочетанного применения гамма-облучения и последующего введения эпиталона

Полученные нами данные о снижении числа делящихся опухолевых клеток и существенном увеличении апоптотических клеток через 3 ч после γ -облучения в дозе 30 Гр и динамике их изменений в последующие сроки в целом совпадают с данными литературы. Однако обращает внимание сохранение высокой пролиферативной активности клеток саркомы М-1 по индексу PCNA. Последнее предполагает, что синтез этого циклина достаточно резистентен к действию ионизирующей радиации даже после подведения больших доз.

На наш взгляд, установленный факт, что эффективность однократного гамма-облучения зависит от объема опухоли на момент лучевого воздействия (рис. 1,б; 2,б), подтверждает роль фракции гипоксических клеток в

радиочувствительности саркомы М-1. Однако не исключено, что низкая радиочувствительность саркомы М-1 обусловлена не только фракцией гипоксических клеток. По нашим последним данным [Южаков В.В. и др., 2005] в клетках саркомы М-1 определяется интенсивная ядерная экспрессия мутантного гена p53, который может оказывать существенное влияние на радиорезистентность этого опухолевого штамма. Возможно, что наличие мутантного гена p53 обуславливает и столь низкий уровень спонтанной апоптотической гибели клеток саркомы М-1.

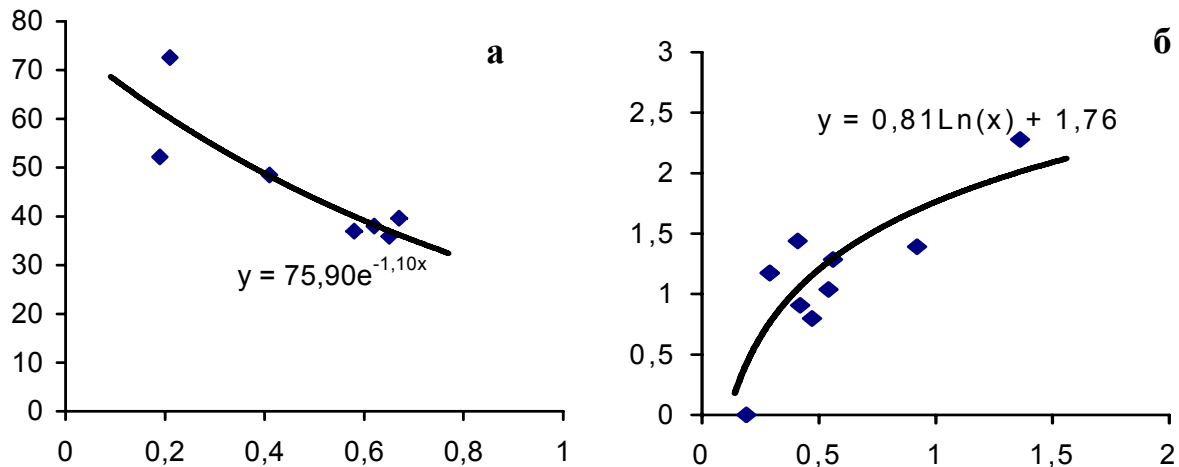


Рис. 2. Влияние объема опухолей на темп их роста в экспоненциальной фазе: а - в контроле; б - при действии γ -облучения в дозе 30 Гр. По оси абсцисс – объем опухолей, по оси ординат - коэффициент роста опухолей.

В последние годы особенно активно ведутся поиски новых средств комбинированной противоопухолевой терапии с использованием не только цитотоксических, но и не цитотоксических препаратов [Olie R. et al., 2000; Kim K et al., 2002; Post D. et al., 2003]. В этой связи обращает внимание интерес исследователей к изучению различных аспектов действия на организм регуляторных пептидов [Хавинсон В.Х. и др., 2003; Лабунец И.Ф. и др., 2004; Коркушко О.В. и др., 2004]. В частности, показана эффективность использования некоторых пептидов в коррекции радиационных иммунодефицитов, а также ингибирующий эффект эпиталона на пролиферативную активность клеток радиочувствительных органов [Смирнов В.С. и др., 1992; Хавинсон В.Х. и др., 2001], что позволило предполагать наличие противоопухолевой активности данного препарата.

Действительно, по нашим данным (рис. 1, в; табл. 2) эпиталон достоверно замедляет рост саркомы М-1. При этом ингибирующий эффект сохраняется примерно в течение 2 недель после окончания курса введения препарата. Кроме того, использование эпиталона увеличило среднюю продолжительность жизни животных на 20%. В результате она составила $44,9 \pm 2,7$ сут ($P_t < 0,04$; $P_U = 0,04$). Результаты комплексного исследования показали, что на фоне введения эпиталона пролиферативная активность опухолевых клеток остается столь же

высокой, как и в контрольной группе (табл. 1). Следовательно, по показателям пролиферативной активности, объективно регистрируемое замедление темпа роста саркомы М-1 не связано с прямым цитостатическим действием этого препарата на опухолевые клетки. Морфологические признаки развития некроза опухолей свидетельствуют о специфическом механизме действия, который, по-видимому, может реализоваться через микроциркуляторное русло.

Таблица 2.

Параметры роста опухолей, лучевые реакции кожи и продолжительность жизни животных в контрольной и подопытных группах.

Группа животных	$G_{(28-35)}$ ($см^3$)	$\alpha_{(28-40)}$	ЛРК (баллы)	$T_{жив}$ (сутки)
1 (контроль)	$14,73 \pm 1,01$ n = 6	1,34 n = 3	—	$37,4 \pm 2,3$ n = 10
2 (γ -облучение в дозе 30 Гр)	$0,8 \pm 0,15$ n = 8	0,08 n = 8	$2,0 \pm 0,3$ n = 15	> 60 n = 10
3 (эпиталон)	$10,89 \pm 1,20$ n = 8 $P_{3,1} < 0,05$	0,88 n = 7	—	$44,9 \pm 2,7$ n = 10 $P_{3,1} < 0,05$
4 (γ -облучение + эпиталон)	$0,9 \pm 0,14$ n = 8 $P_{4,2} > 0,05$	0,08 n = 8	$1,3 \pm 0,3$ n = 15 $P_{4,2} = 0,07$	> 60 n = 10

По нашим данным характерной чертой препаратов после введения эпиталона является появление вокруг сосудов многочисленных клеток, которые окрашиваются толуидиновым синим и дают положительную иммуногистохимическую реакцию на серотонин. В отдельных участках их количественная плотность достигает 90 на 1 мм^2 площади паренхимы опухоли. При использовании метода серийных полутонких - ультратонких срезов эти клеточные элементы были идентифицированы как тучные клетки.

Результаты электронно-микроскопического исследования свидетельствуют, что после введения эпиталона основные события развертываются в периваскулярной строме. При этом появляются многочисленные моноциты, являющиеся, как известно, предшественниками макрофагов, и наряду с естественными киллерами, активированными Т-лимфоцитами и тучными клетками, обладающие противоопухолевой цитотоксичностью. Не исключено, что в «пусковой механизм» сосудисто-стромальных изменений в саркоме М-1, регистрируемых после введения эпиталона, вовлечены вазоактивные медиаторы и, следует полагать, прежде всего, биологически активный амин – серотонин. Ранее проведенные исследования [Хавинсон В.Х. и др., 2001, 2003] показали, что эпиталон оказывает модулирующее действие на синтез серотонина в энтерохромаффинных клетках – основных депо его содержания в организме.

По данным компьютерного анализа в 3-ей группе животных апоптотическая гибель клеток саркомы М-1 увеличилась практически в 2 раза

($I_{\text{апопт}}$ составил $0,67 \pm 0,13\%$). В настоящее время факторы, присутствие или отсутствие которых инициирует запуск генетически запрограммированной смерти клеток, изучены достаточно хорошо [Schwartzman R.A., Cidlowski J.A., 1993]. К числу таких факторов относится и гипоксия. Однако в данном случае объяснить увеличение гибели опухолевых клеток путем апоптоза только за счет нарастающей гипоксии, по-видимому, нельзя. Количественный подсчет пролиферативной активности и апоптотической гибели клеток проводили на смежных полях серийных гистологических срезов. Между тем существуют убедительные иммуногистохимические доказательства, что в зонах гипоксии пролиферативный потенциал опухолевых клеток снижается [Raleigh et al., 1995, Kennedy A.S. et al., 1997]. Если бы зарегистрированное нами увеличение индекса апоптоза было обусловлено только гипоксией, то и пролиферативная активность клеток саркомы должна была снизиться. Поэтому, на наш взгляд, апоптоз, индуцированный после введения эпиталона, может быть обусловлен активизацией клеток микроокружения опухолей, которые обладают прямым цитотоксическим действием, в частности, тучных клеток и моноцитов.

При иммуноокрашивании препаратов на ламинин явных изменений в экспрессии и характере контурирования стенки сосудов после введения эпиталона мы не обнаружили. Однако обратило на себя внимание появление признаков периваскулярного отека и гипоксии прилегающих к сосудам опухолевых клеток.

По данным комплексного анализа (рис. 1, г, табл. 2) на фоне выраженных радиационных эффектов терапевтическое действие эпиталона практически полностью нивелируется. По-видимому, в условиях радиационного повреждения сосудистой сети, подавленной неоваскуляризации и развития гипоксии в опухолях отсутствует структурно-функциональная основа для проявления действия испытуемого препарата. Судя по механизму действия, эпиталон, усиливая некроз паренхимы опухолей, создает предпосылки для повышения фракции гипоксических клеток, являющихся, как известно, наиболее резистентными к лучевой терапии. Поэтому использовать этот препарат в традиционных схемах радиотерапии злокачественных новообразований, на наш взгляд, неоправданно.

Тем не менее, мы не случайно обратили внимание на снижение выраженности ЛРК (табл. 2) в группе животных, леченых эпиталоном. Известно, что в патогенезе ранних лучевых реакций ведущим является острое нарушение гемодинамики в здоровых тканях, преимущественно функционального характера. Несмотря на некоторую субъективность визуальной оценки радиационной травмы по кожным лучевым реакциям, отмеченная тенденция к снижению остроты их проявления свидетельствует о перспективности испытания этого пептида как модификатора биологических реакций для коррекции воспалительных процессов.

ВЫВОДЫ

1. Использование компьютерного анализа изображений при морфофункциональном исследовании реакции радиорезистентной крысиной опухоли саркомы М-1 на воздействие ионизирующей радиации и пептидного препарата «эпиталон» позволило количественно охарактеризовать клеточные проявления повреждений опухоли, связанные с индукцией апоптоза и торможением пролиферативной активности.
2. Саркома М-1 представляет опухоль с высокой пролиферативной активностью и низким уровнем спонтанного апоптоза опухолевых клеток. По данным компьютерного анализа микроскопических изображений в периферической зоне, определяющей рост опухолей, фракция пролиферирующих клеток по индексу PCNA составляет 76,5%, а уровень спонтанной гибели по индексу апоптоза – 0,28%.
3. Индивидуальные колебания эффективности однократного локального гамма-облучения в дозе 30 Гр на саркому М-1 обусловлены объемом опухоли в период воздействия. В период пострadiационного роста саркомы индекс PCNA снижается на 18,6%, в то время как индекс апоптоза увеличивается в 5 раз. Полученные данные соответствуют представлениям, что радиационно-индуцированный апоптоз является одним из важных факторов, обеспечивающих эффективность лучевой терапии опухолей.
4. Введение синтетического тетрапептида эпиталона крысам после подкожной трансплантации саркомы М-1 приводит к торможению роста опухолей. По показателям пролиферативной активности объективно регистрируемое торможение роста не связано с прямым цитостатическим действием этого препарата на опухолевые клетки. Морфологические признаки развития некроза опухолей и усиление в два раза индекса апоптоза опухолевых клеток свидетельствуют о специфическом механизме действия эпиталона, который, возможно, реализуется через сосудистое русло и клетки микроокружения опухолей.
5. Согласно результатам сравнительного гистологического, иммуногистохимического и компьютерного анализа аддитивный онкомодифицирующий эффект эпиталона не регистрируется, по-видимому, из-за наличия выраженных деструктивных изменений в паренхиме опухолей, вызванных гамма-облучением.
6. Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что метод компьютерного анализа изображений позволяет стандартизировать количественную оценку экспрессии маркеров, используемых в онкорadiобиологии, а также расширяет возможность получения объективных данных, необходимых для оценки коррекции дисбаланса между процессами пролиферации и индуцированной гибели опухолевых клеток при разработке схем лучевой и комбинированной терапии на экспериментальных моделях опухолевого роста.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Южаков В.В., Хавинсон В.Х., Курилец Э.С., Кветной И.М., Фомина Н.К. Функциональная морфология саркомы М-1 в «норме» и после гамма-облучения // Высокие технологии в онкологии: Мат-лы V Всероссийского съезда онкологов. (Казань, 4-7 октября 2000 г.) – Ростов н/Д: Изд-во РГМУ, Изд-во РНИОИ, 2000. – Том 1. – С. 237-240.
2. Южаков В.В., Фомина Н.К., Кузнецова М.Н. Морфо-кинетические параметры саркомы М-1 без воздействия и после гамма-облучения // IV Съезд по радиационным исследованиям (Москва, 20-24 ноября 2001 г.): Тезисы докладов. – Москва, 2001. – Т. 2. – С. 500.
3. Хавинсон В.Х., Южаков В.В., Кветной И.М., Малинин В.В., Попучиев В.В., Фомина Н.К. Иммуногистохимический и морфометрический анализ действия вилона и эпиталона на функциональную морфологию радиочувствительных органов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2001. – Т. 131, № 3. – С. 338–346.
4. Южаков В.В., Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Фомина Н.К., Кузнецова М.Н. Кинетика роста и функциональная морфология саркомы М-1 у интактных крыс и после гамма-облучения // Вопросы онкологии – 2001. – Т. 47, № 3. – С. 328–334.
5. Южаков В.В., Фомина Н.К. Применение компьютерного анализа микроскопических изображений в экспериментальной онкордиобиологии // Материалы междисциплинарной конференции с международным участием «Новые биокибернетические и телемедицинские технологии 21 века для диагностики и лечения заболеваний человека» («НБИТТ-21»). – Петрозаводск, 27-29 июня 2002. – С. 40-41.
6. Yuzhakov V.V., Fomina N.K., Konovalov S.S., Kvetnoy I.M., Khavinson V.Kh. Inhibition effect of epitalon on sarcoma M-1 in rats // Environment and human health, The complete Works of International Ecologic Forum June 29 – July 2, 2003, St.Petersburg. – P. 555-556.
7. Фомина Н.К., Южаков В.В. Компьютерный анализ микроскопических изображений для изучения пролиферативной активности и апоптоза опухолевых клеток в экспериментальной онкологии // Всероссийская конференция «Радиобиологические основы лучевой терапии». 19-20 апреля 2005. Изд. Российского университета дружбы народов. – Москва – 2005. – С. 67.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБП метод — метод авидин-биотин-пероксидазного комплекса;

БСП метод — метод биотин-стрептавидин-пероксидазного комплекса;

КРО — коэффициент роста опухолей;

ЛРК — лучевые реакции кожи;

ОК — опухолевые клетки;

ТК — тучные клетки;

ЯО — ядрышковые организаторы;

AgNOR — метод изучения **ЯО** селективным окрашиванием ядер клеток коллоидным раствором нитрата серебра;

PCNA — Proliferating Cell Nuclear Antigen (ядерный антиген пролиферирующих клеток)

Основные стереологические и статистические параметры

S_T — тестовая площадь 1 поля (мм^2);

A_T — общая тестируемая площадь (площадь среза) (мм^2) = $S_T \times$ количество полей;

A_i — общая площадь сечений структуры i (мм^2);

ρ — объемная плотность структур i (интегральный показатель содержания структур в объеме ткани (%)) = A_i/A_T ;

S_i — средняя площадь сечения структуры i (мкм^2);

N_s — общее число сечений структур i на площади среза;

N_i — количественная плотность (число сечений структур i на единицу площади среза) = N_s/A_T ;

$I_{\text{апопт}}$ — индекс апоптоза (%) = $N_{\text{апопт}}/N_{\text{ядер}} \times 100$;

$I_{\text{мит}}$ — митотический индекс (%) = $N_{\text{мит}}/N_{\text{ядер}} \times 100$;

I_c — индекс соотношения = $I_{\text{мит}}/I_{\text{апопт}}$;

I_{PCNA} — индекс PCNA (%) = $N_{\text{PCNA}}/N_{\text{ядер}} \times 100$;

t — срок после имплантации опухоли (сутки);

V — объем опухолей (см^3);

$\alpha_{(t_1-t_n)}$ — коэффициент, отражающий скорость роста опухолей в интервале времени t_1-t_n ;

$T_{\text{жив}}$ — продолжительность жизни животных после имплантации опухолей (сутки);

n — количество животных в группе;