

О.П. Лукашова,
С.В. Шутов

Інститут медичної радіології
ім. С.П. Григор'єва
АМН України,
м. Харків

Дослідження ультраструктури шкіри хворих на рак грудної залози після локального фракційного опромінення пухлини

The study of skin ultrastructure in patients with breast cancer after local fractionated irradiation of the tumor

Цель работы: Определение границ лучевого патоморфоза кожи грудной железы на ультраструктурном уровне для обоснованного выбора линии хирургической резекции при выполнении модифицированной подкожной мастэктомии с первичной реконструкцией с помощью ректоабдоминального лоскута у больных раком грудной железы.

Материалы и методы: С помощью стандартных методов электронной микроскопии изучали ультраструктуру кожи грудной железы на 1-е сутки после локальной фракционной гамма-терапии в суммарной дозе 25 Гр.

Результаты: Установлено, что после облучения в эпидермисе наблюдается вакуолизация цитоплазмы, пикноз ядер, набухание митохондрий в базальных кератиноцитах и клетках шиповидного слоя, расположенного непосредственно над базальным, нарушение межклеточных контактов вплоть до их разрыва, исчезновение базальной мембраны, отслойка эпидермиса от дермы, инфильтрация ее лимфоцитами и макрофагами, лучевой патоморфоз капиллярных сосудов. Степень выраженности этих явлений уменьшается от центра радиационного поля к его краю с исчезновением за пределами 10 %-ной изодозной кривой.

Выводы: Установлены электронномикроскопические критерии радиационного поражения эпидермиса и дермы кожи грудной железы в условиях локальной гамма-терапии; выявлена дозовая зависимость лучевого патоморфоза кожи в соответствии с характеристиками радиационного поля гамма-терапии; для определения границ иссечения облученной кожи при выполнении хирургической реконструкции грудной железы можно применять характеристики радиационного поля гамма-терапии и проводить его за 10 %-изодозной кривой.

Ключевые слова: кожа, гамма-терапия, ультраструктура.

Objective: To determine ultrastructural borders of radiation pathomorphism in the breast skin for substantiation of the choice of surgical resection at modified subcutaneous mastectomy with primary reconstruction by the rectoabdominal flap in breast cancer patients.

Material and Methods: Standard methods of electron microscopy were used to study the breast skin ultrastructure on the 1st day after local fractionated gamma-therapy at a total dose of 25 Gy.

Results: It was established that after irradiation vacuolization of the cytoplasm, nuclear pyknosis, swelling of mitochondria in the basal keratinocytes and cells of the spinous layer located over the basal cells, disturbance of intracellular contacts up to their rupture, disappearing of the basal membrane, detachment of the epidermis from derma, its infiltration with lymphocytes and macrophages, radiation pathomorphism of the capillaries take place in the skin. The degree of these changes decreases from the center of the radiation field to its margins with disappearing outside 10% isodose curve.

Conclusion: Electron-microscopy criteria for radiation lesions of the epidermis and derma of the breast skin in the conditions of local gamma-therapy were established. Dose dependence of skin radiation pathomorphism in accordance with the characteristics of the radiation field was revealed. To determine the margins of irradiated skin resection at surgical reconstruction of the breast, the characteristics of the radiation field can be used; this can be done behind the 10% isodose curve.

Key words: skin, gamma-therapy, ultrastructure.

Рак грудної залози (РГЗ) досі залишається найчастішою причиною смерті від раку — в світі від нього вмирає понад 600 тисяч жінок [1–3], в Україні РГЗ посідає перше-друге місце (20–25 % випадків) у структурі захворюваності та смертності від злоякісних новоутворів серед жінок [2, 4, 5] і його поширеність зростає. Так, за останні 10 років вона збільшилася з 48,8 до 53,7 на 100 тисяч жіночого населення. Саме тому одними з пріоритетних завдань розвитку національних систем охорони здоров'я, рекомендованих ВООЗ віднос-

но РГЗ, є «зниження показників смертності людей до 65 років в середньому на 15 % та забезпечення комплексного лікування з особливим акцентом на одержання результатів і удосконалення якості допомоги з урахуванням прав і бажань пацієнтів» [6].

При цьому крім удосконалення методів лікування (променева терапія, хемотерапія, хірургічні методи та ін.) також необхідно приділяти увагу проблемам реабілітації хворих на РГЗ, оскільки психологічний стан пацієнток є важливим фактором одужання і при злоякіс-

них захворюваннях. Нині хірургічній реабілітації, яка означає відновлення втраченого органа, належить рівноправне місце у комплексній терапії РГЗ. «Золотим» стандартом онкохірургії РГЗ є реконструкція грудної залози за допомогою переміщеного ректоабдомінального шкірного шматка (ПРАШ), яку виконують відразу після радикальної мастектомії [5]. Слід зауважити, що при передопераційній променевої терапії шкіра грудної залози піддається радіаційному ушкодженню, що може призвести до негативних наслідків при виконанні реконструкції. З огляду на це, необхідно визначити критерії радіаційного ураження шкіри, щоб виявити межі між ушкодженою та «здоровою» шкірою, які мають бути враховані при проведенні одномоментної реконструкції грудної залози зазначеним методом у складі комбінованого лікування хворих на РГЗ (курс передопераційного локального опромінювання пухлини та модифікована субкутанна мастектомія) [7]. Слід підкреслити, що рутинні гістологічні методи не дозволяють встановити такі критерії.

Метою даного дослідження є визначення меж променевого патоморфозу шкіри грудної залози на ультраструктурному рівні для обґрунтованого вибору лінії хірургічної резекції при виконанні модифікованої підшкірної мастектомії з первинною реконструкцією (ПРАШ) у хворих на РГЗ.

Методика дослідження

Досліджували шкіру 6 хворих на РГЗ I–II стадії без віддалених метастазів після гамма-терапії і тотальної мастектомії. Передопераційне фракційне локальне опромінювання пухлини грудної залози проводили на апараті Рокус-М у таких умовах: пухлину піддавали дії йонізуючої радіації щодобово п'ятиразово. Одноразова доза становила 5 Гр, сумарна — 25 Гр. Розміри поля визначали згідно з даними УЗД + 1 см здорових тканин навколо пухлини (від 4 × 4 до 6 × 6 см). Під час радикальної мастектомії на 1-шу добу після останнього сеансу гамма-терапії забирали зразки шкіри у 3 координатних зонах відповідно до розподілу поглинутої дози у радіаційному полі, яке описується розташуванням ізодозних кривих: перша координатна зона — діапазон ізодозних кривих 100–70 % від відпущеної дози; друга координатна зона — діапазон ізодозних кривих 60–10 %; третя координатна зона — поза ізодозною кривою 10 %.

Ультраструктуру досліджували за стандартними методами електронної мікроскопії [8]. Орієнтовані шматочки шкіри занурювали спочатку в глутаральдегідний фіксатор за Карновським, потім фіксували у тетраоксиді осмію за Паладе. Після зневоднення в розчинах етано-

лу зростаючої концентрації та в абсолютному ацетоні матеріал заливали у суміш епоксидних смол (епон-аралдит) і полімеризували при температурі 60 °С. Ультратонкі зрізи одержували на ультрамікромомі УМТП-4 Сумського ВО «Електрон» (Україна), контрастували у цитраті свинцю за Рейнольдсом і насиченому розчині ураніл-ацетату та вивчали в електронному мікроскопі ЕМ-125 при прискорюючій напрузі 75 кВ.

Результати та їх обговорення

Електронномікроскопічні дослідження продемонстрували наявність після опромінювання виразних пострадіаційних порушень ультраструктури клітин базального шару епідермісу в першій координатній зоні. Характерним є значна вакуолізація цитоплазми багатьох кератиноцитів з утворенням великих порожнин, які часто містять дрібногранулярний білковий матеріал. Цей процес супроводжується набряканням мітохондрій зі збільшенням їх розміру та віддавленням крист на периферію. Іноді вакуолі заповнюють весь об'єм цитоплазми, стискаючи ядро, яке набуває спотвореної форми та пікнотизується (рис. 1). Порушуються контакти як між базальними клітинами, так і між базальним шаром та дермою із розривом десмосом та напівдесмосом, утворенням міжклітинних щілин, заповнених білковою речовиною і зникненням базальної мембрани (рис. 2). Зустрічаються також темні, функціонально неактивні кератиноцити із гомогенним електроннощільним ядром та розширеним перинуклеарним простором і великим ядерцем. Цитоплазма таких клітин містить переважно тонофібрили.

Основні пострадіаційні зміни тонкої будови остистих кератиноцитів визначаються у шарах епідермісу, розташованих безпосередньо над базальним. Найчастішим є порушення контактів між клітинами. При цьому між плазматичними мембранами утворюються порожнини, які при розриві демосом зливаються, відокремлюючи клітини (рис. 3). Трапляються також остисті кератиноцити з величезними вакуолями, які стискають ядро та призводять до дезорганізації клітин, причому ядра пікнотизуються, їх форма спотворюється, мітохондрії набрякають та вакуолізуються. Більшість же остистих кератиноцитів зберігають нормальну ультраструктуру. Вони мають світлі ядра із деконденсованим хромати-

ном, чітким ядерцем, містять пучки тонофібрил та мітохондрії незміненої структури. У цитоплазмі деяких клітин навколо ядра виникає зона просвітлення цитоплазми, ядро набуває химерної форми, а мітохондрії, розташовані в цій зоні, набрякають та збільшуються у розмірах. Водночас ультраструктура клітин, вище розташованих шарів, не має відхилень від норми.

Описану картину можна пояснити тим, що в епідермісі тільки базальні кератиноцити мають високу радіочутливість, тоді як остисті клітини досить стійкі до дії іонізуючої радіації. У процесі фракційної гамма-терапії ушкоджені, але відносно життєздатні базальні клітини, переходячи до остистого шару, приносять із собою дефекти ультраструктури, які утворилися внаслідок опромінення. Вище же знаходяться кератиноцити, які під час опромінювання вже вийшли з базального шару і стали досить радіостійкими, щоб не реагувати на дію радіації зміною структурно-функціонального стану.

У субепідермальній зоні часто виявляються ланцюжки великих вакуолей (рис. 4), які, зливаючись, обумовлюють відшарування епідермісу від дерми (рис. 5). У дермі цієї зони колагенові волокна розташовуються менш компактно, ніж у нормі, ймовірно, внаслідок явища набряку (рис. 6). Вільні ділянки заповнені безструктурним матеріалом, в якому знаходяться активні фібробласти (див. рис. 6). Характерним для них є подовжене ядро зі смугою гетерохроматину вздовж нуклеолеми та його невеликими грудками в каріоплазмі. У цитоплазмі знаходиться розвинена гранулярна ендоплазматична сітка (гЕПС), у цистернах якої міститься проколаген. Зустрічаються також макрофаги, групи лімфоцитів, окремі лаброцити. Капілярні судини дерми досить різноманітні за будовою. Є невеликі за розміром, округлі, що містять еритроцити та їх складжі. Ядра ендотеліоцитів темні з конденсованим хроматином. Перинуклеарний простір розширений, іноді зовнішня мембрана ядра утворює порожнини, заповнені білковою речовиною. У темній цитоплазмі часом виявляються групи електроннощільних гранул. Окремі судини розширені та складаються з поліморфних ендотеліоцитів (рис. 7) із світлою набряк-

лою цитоплазмою чи вакуолями з дрібногранулярною субстанцією або з темною цитоплазмою, яка утворює випини та вирости, звернені до просвіту капіляра. Іноді такі вакуолі й численні відростки цитоплазми надають судинам мереживного вигляду.

Отже, у першій координатній зоні опромінення відзначаються виражені радіаційні ураження клітин базального шару епідермісу та розташованих над ними остистих кератиноцитів, явища вакуолізації та набряку в неклітинному матриксі дерми, її інфільтрація макрофагами та лімфоцитами, значний променевий патоморфоз капілярних судин.

У другій координатній зоні спостерігаються значно менші пострадіаційні зміни у базальному шарі епідермісу. На перший план виходять порушення міжклітинних контактів, тоді як вакуолізація цитоплазми трапляється рідше. Більшість базальних кератиноцитів мають ядра округлої або подовженої форми зі звивистим контуром, які часто містять чіткі ядерця. У цитоплазмі знаходяться темні пучки тонофібрил, округлі мітохондрії. В окремих випадках ядро оточує зона просвітлення цитоплазми. Темні клітини одиничні.

Ультраструктура остистих кератиноцитів не має відхилень від норми. Лише в остистому шарі, що лежить над базальним, розширені міжклітинні простори, однак розриву десмосом та відокремлення клітин не відзначається.

У сполучнотканинній дермі пучки колагенових волокон розташовані на деякій відстані один від одного. Виявляються численні відростки активних фібробластів з розширеними цистернами гЕПС. Зустрічаються окремі макрофаги. Тонка будова капілярних судин не відхиляється від норми.

Описана ультраструктурна картина свідчить про помірне променеве ураження шкіри в цій зоні з переважними змінами у клітинах базального шару епідермісу та остистих кератиноцитах, розташованих над ними, що проявляється, головним чином, у порушенні міжклітинних контактів.

У третій координатній зоні шкіри кератиноцитам базального шару епідермісу властиві округлі світлі ядра, іноді з невеликими ядерцями, незміненими органелами у цитоплазмі.

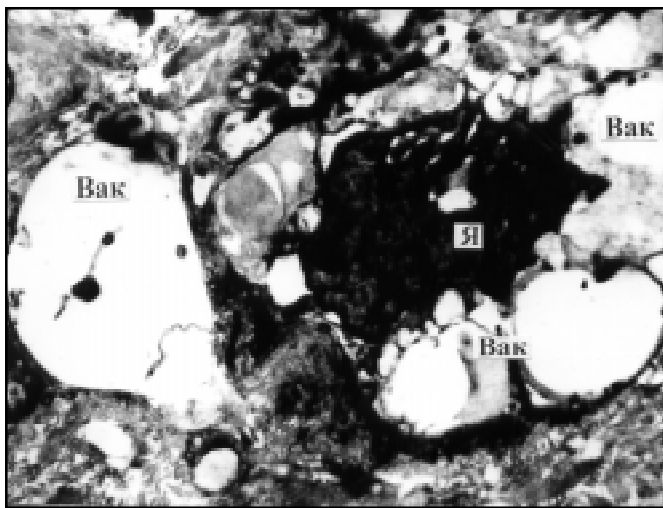


Рис. 1. Базальний шар епідермісу в першій координатній зоні опромінення. Вакуолі, що заповнюють клітину, пікнотичне ядро. Я — ядро, Вак — вакуоль, × 4000

Fig. 1. Basal layer of the epidermis in the first coordinate zone of irradiation. The vacuoles which fill the cell, pyknotic nucleus. Я — nucleus, Вак — vacuole, × 4,000

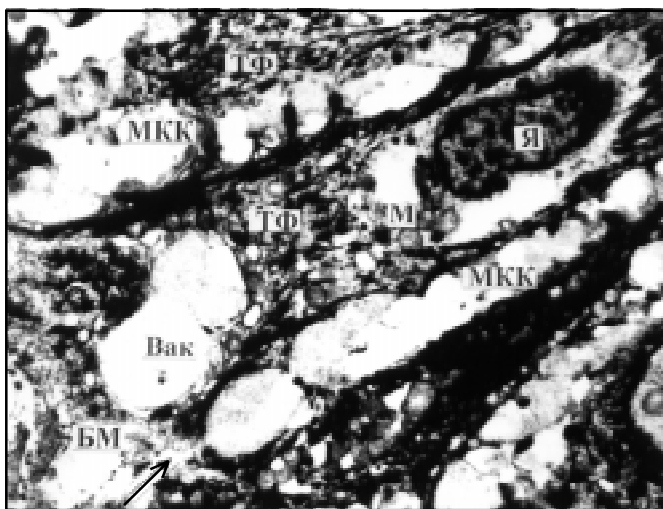


Рис. 2. Базальний шар епідермісу в першій координатній зоні опромінення. Розрив міжклітинних контактів, зникнення базальної мембрани. М — мітохондрії, МКК — міжклітинні контакти, ТФ — тонофібрили, → — зникнення базальної мембрани, БМ — базальна мембрана, × 4000

Fig. 2. Basal layer of the epidermis in the first coordinate irradiation zone. Rupture of the intracellular contacts, disappearing basal membrane. М — mitochondria, МКК — intercellular contacts, ТФ — tonofibrils, → — disappearing basal membrane, БМ — basal membrane, × 4,000

Лише у деяких клітинах є невеликі вакуолі, спостерігаються розходження плазматичних мембран сусідніх кератиноцитів без розриву десмосом та без порушення цілісності базальної мембрани. Подібні зміни міжклітинних зв'язків відзначаються і в остистому шарі, розташованому над базальним, тоді як ультраструктура остистих клітин відповідає нормі (рис. 8).

У дермі третьої координатної зони не виявляється помітних порушень. Сполучна тка-

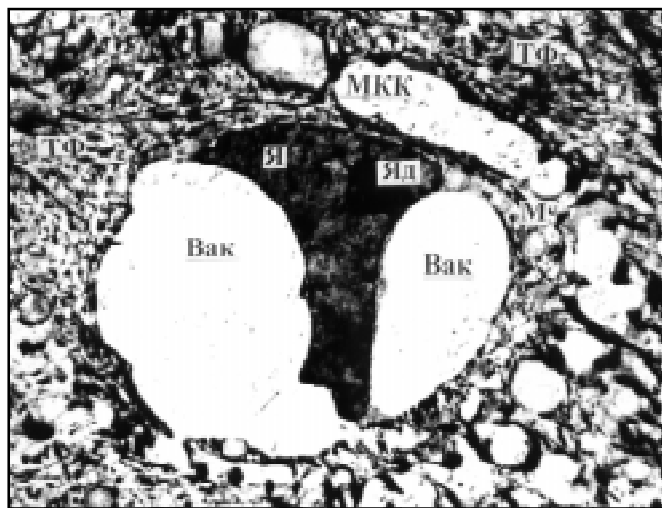


Рис. 3. Остистий шар епідермісу в першій координатній зоні опромінення. Величезні вакуолі, що стискають ядро, розрив контактів між остистими клітинами над базальним шаром. Яд — ядерце, × 4000

Fig. 3. Spinous layer of the epidermis in the first coordinate irradiation zone. Giant vacuoles which compress the nucleus, rupture of the contacts between the spinous cells over the basal layer. Яд — Nucleolus, × 4,000

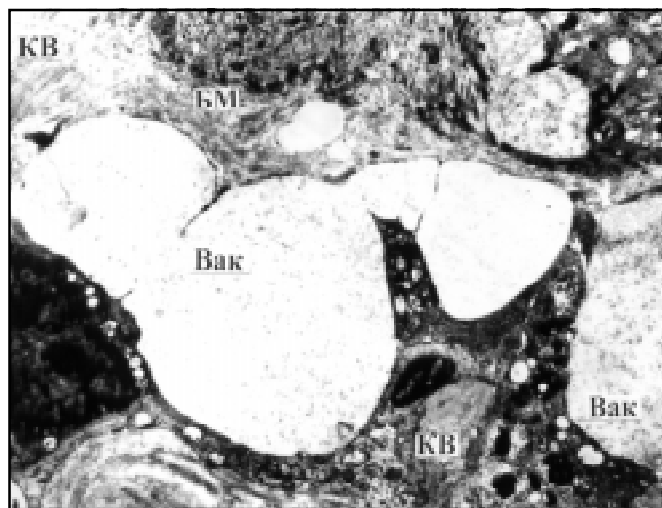


Рис. 4. Дерма шкіри в першій координатній зоні опромінення. Ланцюжок великих вакуолей під епідермісом. КВ — колагенові волокна, × 4000

Fig. 4. Skin derma in the first coordinate irradiation zone. A chain of large vacuoles under the epidermis. КВ — collagen fibers, × 4,000

нина представлена товстими пучками колагенових волокон, що близько прилягають один до одного. Серед них затиснуті функціонально неактивні фібробласти.

Таким чином, у третій координатній зоні опроміненої шкіри грудної залози спостерігаються незначні зміни ультраструктурної організації базального і остистого шарів епідермісу, які перебувають у межах норми. Порушення в дермі відсутні.

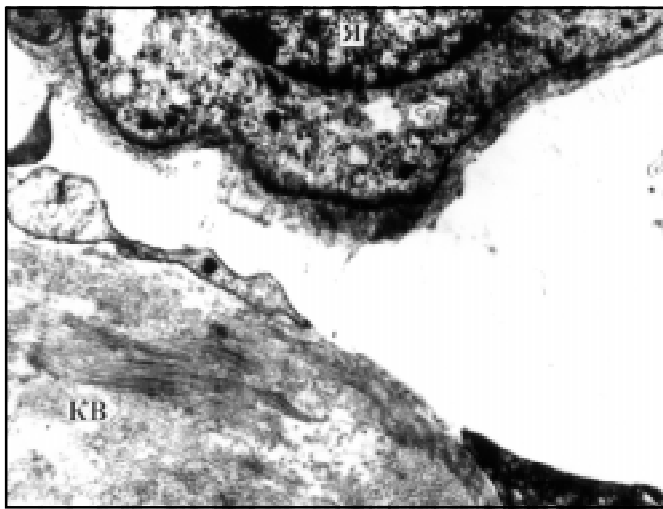


Рис. 5. Дерма шкіри в першій координатній зоні опромінення. Відрив епідермісу від дерми, $\times 4000$

Fig. 5. Skin derma in the first coordinate irradiation zone. Epidermis detachment, $\times 4,000$

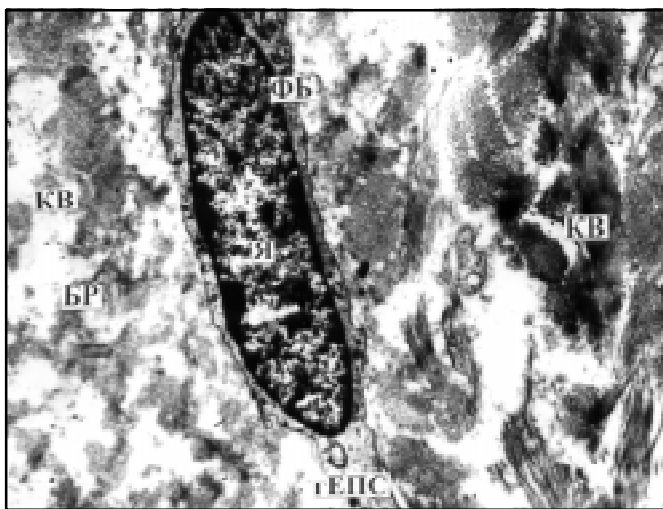


Рис. 6. Дерма шкіри епідермісу в першій координатній зоні опромінення. Фібробласт серед рідко розташованих колагенових волокон і безструктурної гранулярної речовини. ФБ — фібробласт, гЕПС — гранулярна ендоплазматична сітка, БР — безструктурна речовина, $\times 4000$

Fig. 6. Skin epidermis in the first coordinate irradiation zone. A fibroblast among occasional collagen fibers and structureless granular tissue. ФБ — fibroblast, гЕПС — granular endoplasmic network, БР — structureless substance, $\times 4,000$

Проведені дослідження дозволяють встановити ознаки радіаційного ушкодження шкіри грудної залози після локальної гамма-терапії. До них належать вакуолізація цитоплазми, пікноз ядер, набряк мітохондрій у базальних кератиноцитах та клітинах остистого шару, розташованого безпосередньо над базальним, порушення міжклітинних контактів (навіть до їх розриву), зникнення базальної мембрани, відшарування епідермісу від дер-

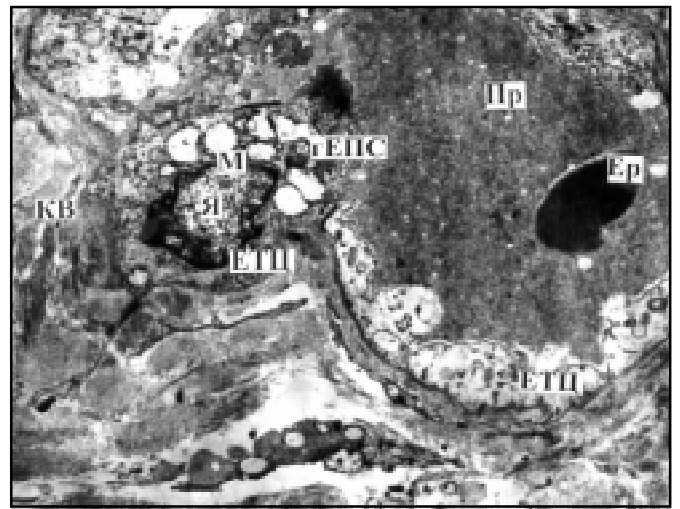


Рис. 7. Дерма шкіри в першій координатній зоні опромінення. Розширена судина, вистелена поліморфними ендотеліоцитами. Набряк ендотеліоцитів та мітохондрій, розширення гЕПС. ЕТЦ — ендотеліоцит, Пр — просвіт судини, Ер — еритроцит, $\times 4000$

Fig. 7. Skin derma in the first coordinate irradiation zone. A dilated vessel layered with polymorphic endotheliocytes. Edema of endotheliocytes and mitochondria widened granular endoplasmic network. ЕТЦ — Endotheliocyte, Пр — lumen, Ер — erythrocyte, $\times 4,000$

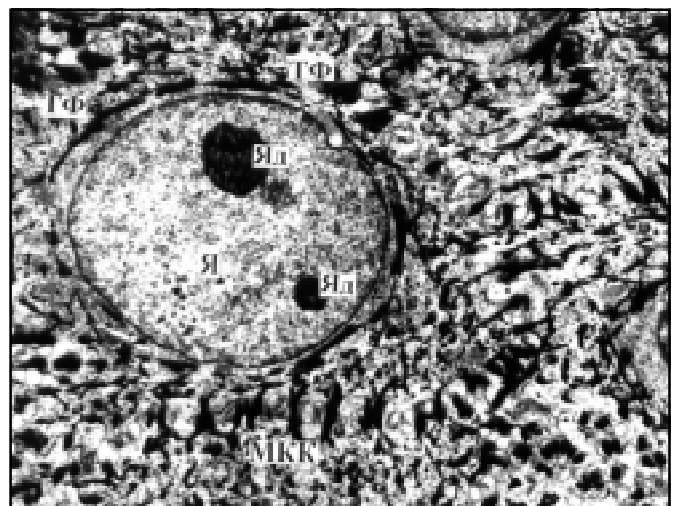


Рис. 8. Остистий шар епідермісу в третій координатній зоні опромінення. Остистий кератиноцит нормальної будови, $\times 4000$

Fig. 8. Spinous layer of the epidermis in the third coordinate irradiation zone. Normal spinous keratinocyte, $\times 4,000$

ми, набряк сполучнотканинної строми дерми, інфільтрація її лімфоцитами та макрофагами, променевий патоморфоз капілярних судин.

Отримані дані дозволяють оцінити ступінь радіаційного ураження шкіри в різних зонах після опромінення. Так, у першій координатній зоні, де формується основна доза, ушкодження найбільш виразні, в другій — менші, в третій — майже відсутні.

Той факт, що поза 10 %-вою ізодозною кривою не простерігається ознак ураження, свідчить про те, що саме в цих межах можна проводити резекцію шкіри при виконанні реконструкції грудної залози. Протокол опромінення з характеристикою радіаційного поля, який містить кожна історія хвороби, дозволяє визначити ці межі.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено електронномікроскопічні критерії радіаційного ураження епідермісу та дерми шкіри грудної залози в умовах локальної фракційної гамма-терапії.

2. Виявлена дозова залежність променевого патоморфозу шкіри відповідно до характеристик радіаційного поля гамма-терапії.

3. Для визначення меж резекції опроміненої шкіри при виконанні хірургічної реконструкції грудної залози можна застосовувати характеристики радіаційного поля гамма-терапії і проводити її поза 10 %-вою ізодозною кривою.

Література

1. WHO National Cancer Control Programmes. — Geneva. — WHO, 2002. — 180 p.
2. Шалімов С.О., Федоренко З.П. Стан протиракової боротьби в Україні // Матер. X з'їзду онкологів України. — К.: Абсолют. — 2001. — С. 3–4.
3. Напалков Н.П. Демографический процесс и злокачественные новообразования // Матер. III съезда онкологов и радиологов СНГ. — Минск: Тонпик, 2004. — Ч. I. — С. 15–24.
4. Грубник В.В., Степула В.В., Соколов В.Н. Заболевания молочной железы. — Одесса: Астро-принт, 1999. — 214 с.
5. Бондарь Г.В., Седаков И.Е., Смирнов В.Н., Алиева С.О. Развитие методов лечения рака молочной железы // Матер. III съезда онкологов и радиологов СНГ. — Минск: Тонпик, 2004. — Ч. I. — С. 100–103.
6. WHO: Health for all in the twenty-first century. — Geneva, WHO, 1998. — 230 p.
7. Пат. 64399 А, Україна, МКІ 7 А61В17/00. Спосіб комплексного лікування хворих на рак грудної залози з одномоментною реконструкцією грудної залози / Шутков С.В. (UA). — №2003054767; Заявл. 27.05.2003; Опубл. 16.02.2004. Бюл. № 2.
8. Гайер Г. Электронная гистохимия. — М.: Мир, 1974. — 488 с.

Надходження до редакції 12.10.2005.

Прийнято 08.11.2005.

Адреса для листування:
Лукашова Ольга Петрівна,
ІМР ім. С.П. Григор'єва АМН України,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна