

О.П. Лукашова,
О.М. Сухіна,
О.А. Немальцова,
І.М. Кругова,
В.С. Сухін,
Л.В. Забобоніна

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

Особенности ультраструктуры плоскоклеточного рака шейки матки после хрономодулированной радиохемотерапии

Ultrastructure of squamous-cell cervical cancer after chronomodulated radiochemotherapy

Цель работы: Оценка эффективности противоопухолевой химиолучевой терапии больных раком шейки матки (РШМ) II–III стадии по данным ультраструктурного анализа с учетом времени проведения лечения.

Материалы и методы: 16 больным РШМ II–III стадии проводили химиолучевую терапию с помощью дистанционного облучения на аппарате РОКУС-АМ и внутрисполостного — на аппарате АГАТ-В с предварительной синхронизацией клеток опухоли 5-фторурацилом (5-ФУ) в двух группах больных: I — струйное введение 5-ФУ проводили на протяжении 12 часов в период с 12.00 до 24.00, II — в период с 18.00 до 6.00, за 8 часов до облучения. Суммарная доза облучения составляла 40 Гр, суммарная доза 5-ФУ — 5 г. Ультраструктуру опухолевых клеток изучали с помощью стандартных методов электронной микроскопии.

Результаты: Установлено, что после химиолучевого воздействия в ряде случаев в опухолях выявляются раковые клетки, ультраструктура которых свидетельствует о сохранном морфофункциональном состоянии. Однако если в интактных опухолях в цитоплазме раковых клеток обнаруживаются преимущественно свободные рибосомы и полисомы, то после проведенного лечения в ней преобладают расширенные цистерны шероховатой эндоплазматической сети, что свидетельствует об изменении функциональной направленности белково-синтетических процессов. Комплексная химиолучевая терапия приводит к достоверному снижению числа случаев выживания раковых клеток, что указывает на высокую эффективность лечения. Однако различий между двумя схемами хронотерапии не выявлено.

Выводы: Эффективность комплексной химиолучевой терапии не зависит от времени ее проведения; в обеих группах терапии остаются случаи, когда не только выявляются опухолевые клетки, но и сохраняется их жизнеспособность, что может приводить к рецидивам; проведенная терапия вызывает изменения структурно-функционального состояния опухолевых клеток, в частности, переключение белково-синтетической деятельности с выработки белковых веществ для собственных нужд на синтез их продукции «на экспорт».

Ключевые слова: рак тела матки, хронотерапия, ультраструктура клеток.

Objective: To assess the efficacy of anti-tumor chemoradiotherapy in patients with stage II-III cervical cancer (CC) using the findings of ultrastructure analysis with consideration of the time of treatment.

Material and Methods: Sixteen patients with stage II-III CC were performed chemoradiation therapy using distance irradiation with ROCUS-AM unit and intracavitary irradiation with AGAT-B unit with preliminary synchronization of the tumor cell with 5-fluorouracil (FF) in two groups of patients: group 1 — administration of 5-FU from 12 a.m. to 12 p.m., group 2 — from 6 p.m. to 6 a.m. 8 hours prior to the irradiation.

Total irradiation dose was 40 Gy, total FU-5 dose was 5 g. The tumor cell ultrastructure was investigated using standard methods of electron microscopy.

Results: Cancer cells the ultrastructure of which suggested preserved morphofunctional state were revealed after the irradiation in a number of cases. But if in intact tumor cells chiefly free ribosomes and polysomes are observed, dilated cisterns of uneven endoplasmic reticulum were present after treatment, which suggested the changes in the protein-synthesis processes. Complex chemoradiation therapy results in considerable reduction of the number of cases of tumor cell survival which suggested a high efficacy of the treatment. But the difference between the two schemes of chronotherapy were not revealed.

Conclusion: Chemoradiation treatment efficacy does not depend on the time of administration. In the both groups of therapy there are cases with preserved tumor cells retaining their viability which may cause disease relapses. The administered therapy causes the changes in the structural functional state of the tumor cells, in particular, switching of protein synthesis from protein substance production to satisfy the own needs to production for “export”.

Key words: cervical cancer, chronotherapy, cells ultrastructure.

Мета роботи: Оцінка ефективності протипухлинної хемопроменевої терапії хворих на рак шийки матки (РШМ) II–III стадії за даними ультраструктурного аналізу з урахування часу проведення лікування.

Матеріали і методи: 16 хворим на РШМ II–III стадії проводили хемопроменеву терапію з допомогою дистанційного опромінювання на апараті РОКУС-М і внутріпорожнинного — на апараті АГАТ-В з попередньою синхронізацією клітин пухлини 5-фторурацилом (5-ФУ) у двох групах хворих: I — струмінне введення 5-ФУ проводили протягом 12 годин у період з 12.00 до 24.00, II — з 18.00 до 6.00, за 8 годин до опромінювання. Сумарна доза опромінення становила 40 Гр, 5-ФУ — 5 г. Ультраструктуру пухлинних клітин вивчали з допомогою стандартних методів електронної мікроскопії.

Результати: Встановлено, що після хемопроменевої дії в деяких випадках у пухлинах виявляються ракові клітини, ультраструктура яких свідчить про цілісність морфофункціонального стану. Однак якщо в інтактних пухлинах у цитоплазмі ракових клітин виявляються головним чином вільні рибосомы та полісомы, то після проведенного лікування в ній переважають розширені цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки, що свідчить про зміни функціональної спрямованості білково-синтетичних процесів. Комплексна хемопроменева терапія сприяє вірогідному зниженню кількості випадків виживаності ракових клітин, що підтверджує високу ефективність лікування. Втім, відмінностей між двома схемами хронотерапії не виявлено.

Висновки: Ефективність комплексної хемопроменевої терапії не залежить від часу її проведення; в обох групах терапії залишаються випадки, в яких не лише виявляються пухлинні клітини, але й зберігається їх життєздатність, що може призводити до рецидивів; проведена терапія викликає зміни структурно-функціонального стану пухлинних клітин, зокрема, переключення білково-синтетичної діяльності з вироблення білкових речовин для власних потреб на синтез їх продукції «на експорт».

Ключові слова: рак тіла матки, хронотерапія, ультраструктура клітин.

За останні десятиріччя в клінічній онкології досягнуто істотних успіхів у діагностиці та лікуванні раку шийки матки (РШМ). Проте дана патологія продовжує залишатися серйозною проблемою в онкогінекології, посідаючи друге місце у світі серед усіх злякисних новоутворів жіночих статевих органів (29,4 %) [1, 2].

Пошук нових ефективних способів лікування спрямований на удосконалення існуючих методів і методик протипухлинної терапії шляхом оптимізації разових і сумарних доз опромінення, об'єму опромінюваних тканин, режимів фракціонування та використання радіомодифікувальних засобів (препаратів платини, 5-фторурацилу, гідреа та ін.) [3–5].

Протипухлинні препарати, застосовувані в комбінованій терапії, посилюють променеве ушкодження пухлинних клітин, синхронізують вступ їх до найбільш радіочутливих фаз клітинного циклу та зменшують кількість таких клітин у фазі спокою, тим самим підвищуючи ефективність лікування (збільшення терміну безрецидивного періоду) [4, 6, 7]. Однак поряд з цим зростає інтенсивність побічних ефектів, що іноді змушує припинити терапію.

За даними літератури та результатами власних досліджень, використання режимів протипухлинної променевої та хемопроменевої терапії з урахуванням циркадних ритмів сприяє зниженню токсичності лікування [8–11]. Але не виключено, що застосування цього методу може водночас зменшувати ураження і пухлинних клітин. У зв'язку з цим необхідним стає визначення впливу різних схем хронотерапії на їх життєздатність, зокрема, за допомогою електронної мікроскопії.

Тому метою даної роботи стала оцінка ефективності протипухлинної хеморадіотерапії хворих на РШМ II–III стадії за даними ультраструктурного аналізу з урахуванням часу проведення лікування.

Методика дослідження

Було досліджено пухлини 16 пацієнток, хворих на РШМ T2b–3bNxM0 стадії, яким проводили лікування за розробленим методом хронотерапії хемопроменевої терапії [12] з використанням дистанційного опромінювання на апараті РОКУС-М та внутрішньопорожнинного — на апараті АГАТ-В із синхронізацією клітин пухлини 5-фторурацилом (5-ФУ). Матеріал забирали після досягнення сумарної дози опромінення, ізоєфективної 40 Гр, сумарна доза 5-ФУ на цей термін складала 5 г. Залежно від часу введення 5-ФУ хворих було розподілено на 2 групи:

I — струмінне введення протягом 12 годин з 12.00 до 24.00 з наступним опромінюванням через 8 годин — 8 пацієнток;

II — струмінне введення протягом 12 годин з 18.00 до 6.00 з наступним опромінюванням через 8 год. — 8 осіб. За контроль правили пухлини 10 хворих на РШМ до проведення лікування.

Гістологічно в усіх випадках верифіковано плоскоклітинний рак (ПКР) шийки матки.

Матеріал, одержаний при біопсії шийки матки, обробляли за допомогою стандартних методів електронної мікроскопії [13]. Шматочки пухлини розміром не більше 1 мм³ занурювали у глютаральдегідний фіксатор за Карновським, потім у осмієвий фіксатор за Палладе. Після дегідратації у розчинах етанолу зростаючої концентрації та абсолютному ацетону матеріал заливали у суміш епоксидних смол (епон-аралдит) і полімеризували при 60 °С протягом 36 год. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультрамікромомі УМТП-4 Сумського ВО «Електрон» (Україна), контрастували у насиченому розчині уранілацетату та цитрату свинцю за Рейнольдсом і аналізували в електронному мікроскопі EM-125 того ж ВО.

Результати проведених досліджень обробляли за непараметричним критерієм (точний метод Фішера (Р тмф), з використанням пакета програм для ПК Biostatistics v.4.03.

Результати та їх обговорення

Електронномікроскопічні дослідження показали, що ПКР шийки матки характеризується досить значним поліморфізмом клітин, причому пухлинам кожного хворого властиві свої особливості ультраструктури.

Спільною для клітин ПКР в усіх випадках була лише наявність у цитоплазмі тонофібрил, кількість яких значно варіює від тонких окремих волокон (рис. 1) до товстих пучків, які кільцем оточують ядро (рис. 2). Ядра клітин, переважно світлі, з деконденсованим хромати-

ном і 1–2 чіткими ядерцями, бувають округлими, овальними, але часто мають примхливу форму з бухтоподібними заглибленнями, які іноді поділяють ядра на фрагменти. Розмір ядра і об'єм цитоплазми також значно відрізняються. Низькодиференційовані клітини мають велике ядро і багато цитоплазми, заповненої переважно рибосомами та полісомами, з невеликою кількістю мітохондрій, лізосом і тонофібрил. У більш диференційованих клітинах ядро невелике, а вузьку облямівку цитоплазми заповнюють темні пучки тонофібрил, тоді як інші органи складають меншість (див. рис. 2). У деяких випадках у досить об'ємній цитоплазмі розташовуються тонковолокнисті структури, а кількість рибосом та полісом незначна. Іноді виявляються великі фагосоми. Зрідка зустрічаються темні пухлинні клітини (рис. 3), одні з яких можуть нагадувати за будовою типові світлі форми, а інші — дуже від них відрізняються. Для останніх характерним є темне, різко зменшене у розмірі ядро, а в цитоплазмі щільно розміщуються численні мітохондрії з просвітленим матриксом і чіткими кристами. Досить часто між клітинами порушені контакти, і вони утримуються одна біля одної завдяки десмосомам, а у міжклітинний простір випинаються численні цитоплазматичні ворсинки.

Виявляються пухлинні клітини у стані мітотичного, іноді амітотичного поділу (див. рис. 3). Зрідка спостерігається апоптична загибель клітин, в яких ядро набуває специфічного вигляду: темні грудки хроматину зосереджуються біля нуклеолеми, а основний об'єм заповнює дрібногранулярна речовина.

Звичайним явищем можна вважати проникнення між пухлинними клітинами нейтрофільних та еозинофільних лейкоцитів, а також лімфоцитів та моноцитів, що може бути пов'язаним з некротичними процесами, які часто супроводжують злоякісні новоутвори.

Електронномікроскопічне дослідження матеріалу з пухлин хворих групи I показало, що лише у половині випадків виявляються пухлинні клітини (табл. 1). Вони великі за розміром, світлі ядра містять чіткі ядерця, цитоплазматичні включення (рис. 4). Іноді глибокі фіордоподібні вдавлення перетинають

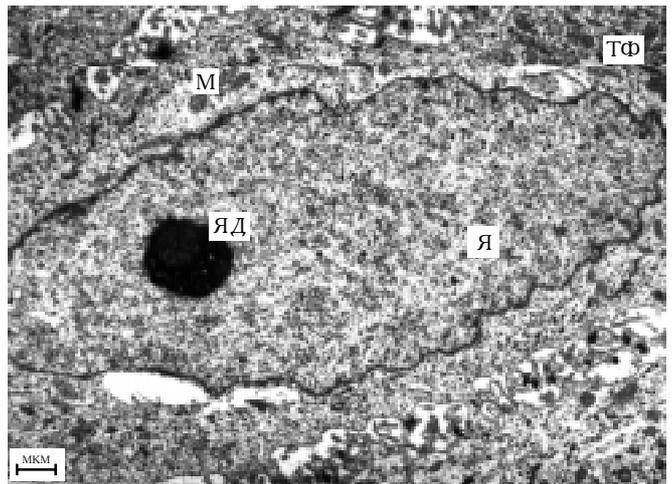


Рис. 1. Низькодиференційована ракова клітина із світлим ядром, чітким ядерцем, численними рибосомами та полісомами, одиничними тонофібрилами та мітохондріями у цитоплазмі в інтактній пухлині шийки матки: Я — ядро; ЯД — ядерце; ТФ — тонофібрили; М — мітохондрії

Fig. 1. Poorly differentiated cancer cell with a light nucleus, distinct nucleolus, numerous ribosomes and polysomes, solitary tonofibrils and mitochondria in the cytoplasm in the intact cervical tumor. Я — nucleus; ЯД — nucleolus; ТФ — tonofibrils; М — mitochondria

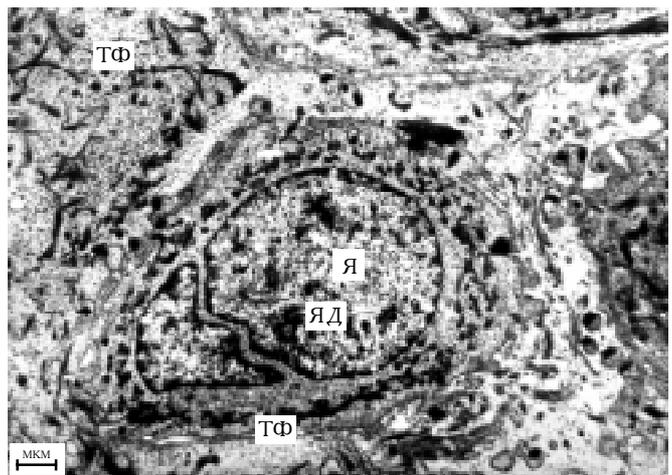


Рис. 2. Ракова клітина з численними пучками тонофібрил, які оточують ядро, в інтактній пухлині шийки матки

Fig. 2. A cancer cell with numerous bundles of tonofibrils surrounding the nucleus in an intact cervical tumor

ядро в різних напрямках. Цитоплазму більшості клітин заповнюють розширені порожнини гЕПС із гранулярним білковим вмістом, серед яких зустрічаються одиничні мітохондрії, первинні та вторинні лізосоми, вільні рибосоми та полісоми, кількість тонофібрил невелика. У деяких — основним компонентом цитоплазми є хаотично розташовані тонкі фібрили, серед яких досить багато дрібних мітохондрій, частка вільних рибосом та полісом незначна, а гЕПС відсутня.

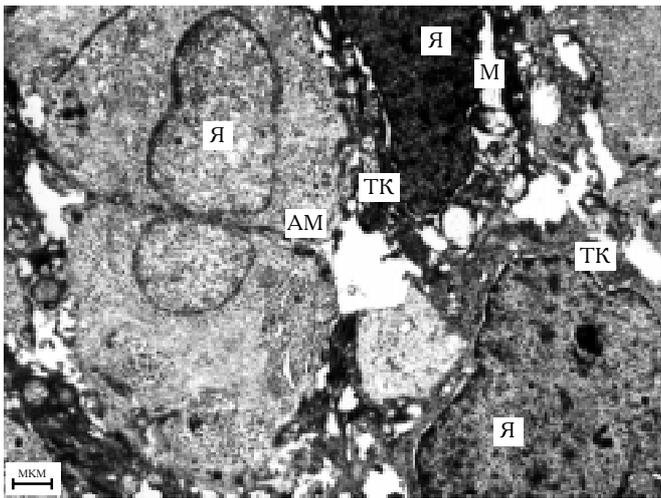


Рис. 3. Темні ракові клітини та клітина у стані аміотичного поділу в інтактній пухлині шийки матки. ТК — темна клітина; АМ — амітоз

Fig. 3. Dark cancer cells and a cell in the state of mitosis in an intact cervical tumor. ТК — a dark cell; АМ — amitosis

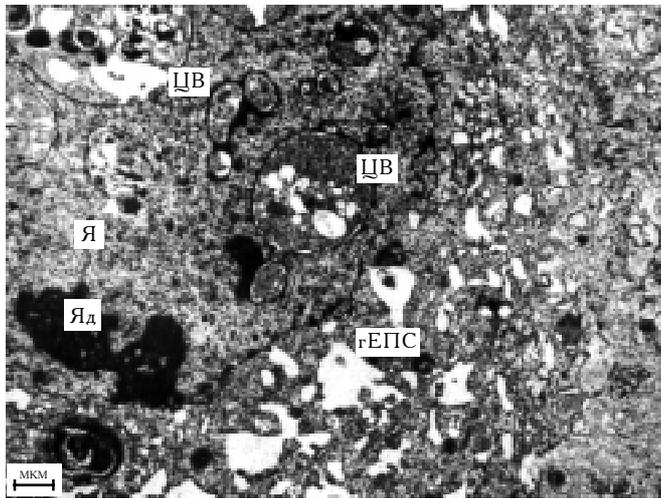


Рис. 4. Ракова клітина, у ядрі якої багато цитоплазматичних включень, а у цитоплазмі розташовуються розширені цистерни гранулярної цитоплазматичної сітки, у пухлині шийки матки хворої I групи терапії. ЦВ — цитоплазматичні включення; гЕПС — гранулярна ендоплазматична сітка

Fig. 4. A cancer cell with numerous cytoplasmic inclusions in the nucleus with dilated cisterns of granular cytoplasm network in the cytoplasm in a cervical tumor from group 1. ЦВ — cytoplasm inclusions; гЕПС — granular endoplasmic reticulum

Зрідка у цитоплазмі спостерігається наявність великих фагосом, у вмісті яких можна розпізнати цілі пухлинні клітини із ядром спотвореної форми, скупченнями пучків тонофібрил, набряклими мітохондріями тощо (рис. 5). Часто порушені міжклітинні контакти.

У 6 випадках з 8 у матеріалі, одержаному після проведеного лікування хворих групи II, не виявлено пухлинних клітин (див. табл. 1). Замість них спостерігаються великі ділянки, заповнені фібрином, серед волокон якого можна

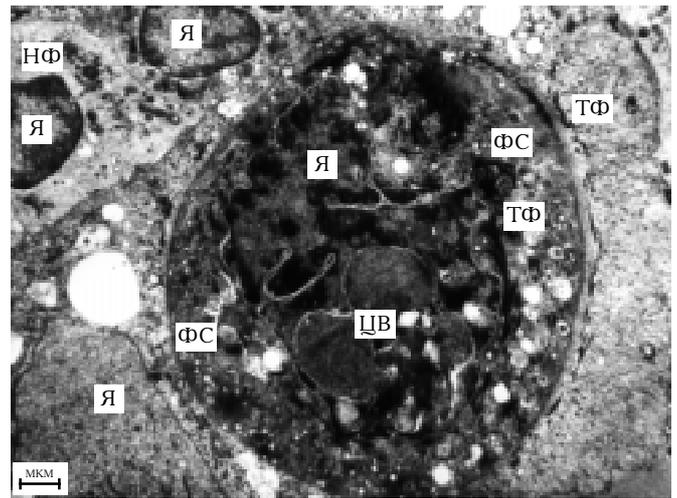


Рис. 5. Ракова клітина, яка фагоцитувала таку ж клітину у пухлині шийки матки хворої I групи терапії. ФС — фагосома; НФ — нейтрофільний лейкоцит

Fig. 5. A cancer cell which phagocytosed similar cell in the cervical tumor of the patient from group 1. ФС — phagosome; НФ — neutrophilic leukocyte

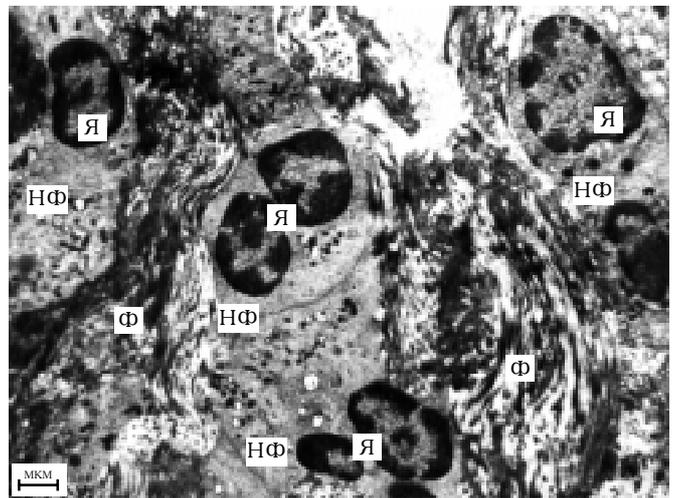


Рис. 6. Ділянка, зайнята волокнами фібрину та нейтрофільними лейкоцитами, на місці пухлині шийки матки хворої II групи терапії. Ф — фібрин

Fig. 6. An area occupied by fibrin fibers and neutrophilic leucocytes on the place of a cervical tumor of a patient from group 2. Ф — fibrin

знайти клітинний детрит, еритроцити, нейтрофільні лейкоцити (рис. 6), макрофаги з первинними та вторинними лізосомами. Часто фібрин заміщується сполучною тканиною. З'являються фібробласти з розвиненою гЕПС, колагенові волокна (рис. 7).

Пухлинні клітини виявляються тільки у двох випадках. Вони розташовані полями, невеликі за розміром, мають ядро примхливої форми з деконденсованим хроматином, темним ядрцем (рис. 8). Цитоплазма вміщує небагато

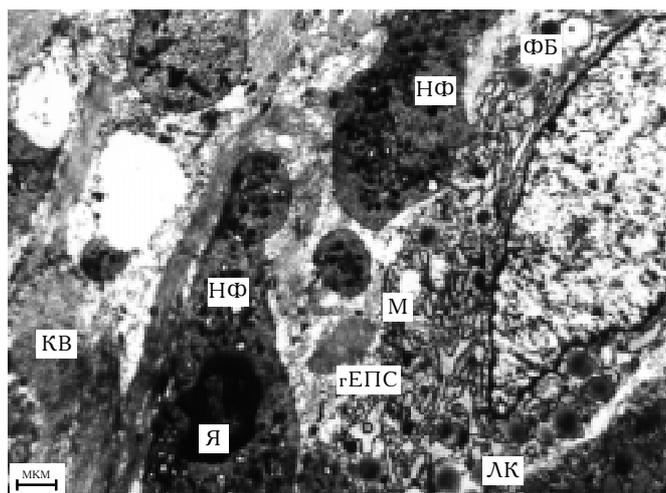


Рис. 7. Фібробласт, колагенові волокна та нейтрофільні лейкоцити на місці пухлини шийки матки хворої II групи терапії. ФБ — фібробласт; КВ — колагенові волокна; ЛК — ліпідна краплина

Fig. 7. Fibroblast, collagen fibers and neutrophilic leucocytes on the place of cervical tumor of a patient from group 2. ФБ – fibroblast; КВ – collagen fibers; ЛК – lipid drop



Рис. 9. Ракова клітина, оточена колагеновими волокнами, яка містить грубі темні тільця ліпідної природи, у пухлині хворої II групи терапії

Fig. 9. A cancer cell surrounded by collagen fibers containing coarse dark lipid bodies in a patient from group 2

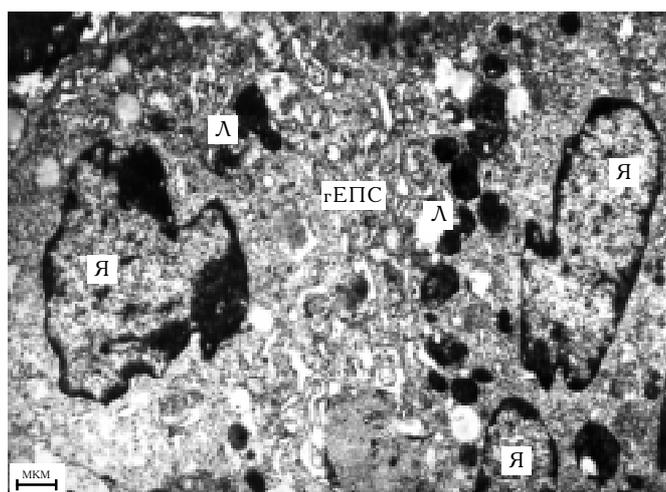


Рис. 8. Ракові клітини, які збереглися у пухлині шийки матки хворої II групи терапії. Л — лізома

Fig. 8. Cancer cells preserved in a cervical tumor in the patient from group 2. Л – lysosome

вільних рибосом та полісом, дещо розширені профілі rЕПС, групи лізосом, окремі фібрили, одиничні світлі ліпідні краплини, набряклі мітохондрії. Поряд з клітинами, які досить життєздатні, розташовуються ділянки некрозу з клітинним детритом та нейтрофільними лейкоцитами. Трапляються також ракові клітини з грубими темними тільцями, що вміщують ліпідні (рис. 9), а у деяких з них цитоплазма заростає тонкими волокнами, які заміщують інші органели. Як правило, такі клітини оточені пучками колагенових волокон і, очевидно, функціонально неактивні.

Таким чином, ракові клітини, які вижили після проведеного лікування, зберігають життєздатність, хоч дещо змінюють свою функцію-

Таблиця 1

Результати застосування різних схем хронорадіохемотерапії при лікуванні плоскоклітинного РШМ
The results of application of different schemes of chronoradiochemotherapy at treatment of squamous-cell cervical cancer

Серія	Всього випадків	Пухлинні клітини				P _{мп} контроль	P _{мп I – II}
		є		немає			
		Абс.	%	Абс.	%		
Контроль (до терапії)	10	10	100,0	–	–		
I група	8	4	50,0	4	50,0	0,023	
II група	8	2	25,0	6	75,0	0,002*	0,608
I + II група	16	6	37,5	10	62,5	0,003*	

* Вірогідно відносно серії «контроль», p < 0,05.

нальну спрямованість. Так, якщо в інтактних пухлинах білковий синтез відбувається на вільних рибосомах та полісомах, тобто для власних потреб: процесів росту, поділу, вироблення тонофібрил тощо, то після дії хемо- та променевого факторів починають переважати процеси продукування та накопичування білкових речовин у цистернах гЕПС, що, як відомо, свідчить про їх синтез «на експорт». Подібне явище спостерігається і в експериментальних дослідженнях на карциномі Герена [14]. Посилення ж фагоцитарної активності пухлинних клітин може бути пов'язане із її стимулюванням внаслідок загибелі частини клітинної популяції.

Крім досліджень ультраструктури клітин ПКР шийки матки, була зроблена спроба статистично довести вплив хронотерапії на результат лікування. Для цього у кожній групі визначали кількість хворих, у яких, за даними електронної мікроскопії, виявлено життєздатні ракові клітини, і обчислювали вірогідність відмінностей цього показника між контрольною групою (інтактні пухлини до лікування) та усіма групами терапії, а також між I та II групами хрономодульованого лікування (див. табл. 1).

Було встановлено, що комплексна радіохемотерапія в усіх серіях приводить до вірогідного зниження кількості випадків збереження ракових клітин, що свідчить про досить високу її ефективність. Проте відмінностей між двома схемами хронотерапії не виявлено (див. табл. 1, $p = 0,608$). З одного боку, це може свідчити про незалежність загибелі пухлинних клітин від добового періоду проведення терапії, а, з іншого — дає можливість використовувати ту схему хрономодуляції, яка викликає найменші побічні ефекти.

ВИСНОВКИ

1. Ефективність комплексної хеморадіотерапії не залежить від часу її проведення.

2. В обох серіях дослідів залишаються випадки, в яких не тільки виявляються пухлинні клітини, але й зберігається їх життєздатність, що може призводити до рецидивів.

3. Внаслідок проведення терапії відбуваються зміни структурно-функціонального стану пухлинних клітин, зокрема переключення білково-синтетичної діяльності із синтезу білкових речовин для власних потреб до синтезу їх продукції «на експорт».

Література

1. Рак в Україні 2005–2006: Бюлетень Національного канцер-реєстру України. — К., 2006. — № 6. — 65 с.
2. Jemal A., Murray T., Samuels A. et al. // *Cancer J. Clin.* — 2003. — № 53. — P. 5–26.
3. Винокуров В.Л. // *Вопр. онкол.* — 2003. — Т. 49, № 5. — С. 656–663.
4. Іванкова В.С., Курило Г.О., Шевченко Г.М. та ін. // *УРЖ.* — 2005. — Т. XIII, вип. 3. — С. 304–307.
5. Семікоз Н.Г., Думанський Ю.В., Купріяноко Н.В. та ін. // *Там же.* — С. 381–382.
6. Виноградов В.М. Основные принципы химиолучевой терапии // *Матер. III съезда онкологов и радиологов СНГ.* — Минск, 2004. — Ч. 2. — С. 329–330.
7. Тюляндин С.А., Марьяна Л.А. Химиолучевая терапия местнораспространенного рака шейки матки // *Матер. VII Рос. онкол. конф. (Москва, 25–27 нояб. 2003 г.).* — М.: Издат. группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. — С. 111–115.
8. Галахін К.О., Іванкова В.С., Воробйова Л.І. та ін. // *УРЖ.* — 2005. — Т. XIII, вип. 3. — С. 281.
9. Березкин М.В. Хронобиологические аспекты в онкологии // *Хронобиология и хрономедицина / Под ред. Ф.И. Комарова.* — М.: Медицина, 1989. — С. 82–90.
10. Бланк М.А., Рябых Т.П. Хроноонкология // *Хронобиология и хрономедицина / Под ред. Ф.И. Комарова, С.И. Рапопорта.* — М.: Триада, 2000. — С. 323–355.
11. Семікоз Н.Г., Шлопов В.Г. Лучевой патоморфоз органов и тканей малого таза при лечении рака тела и шейки матки. — Донецк: Китис, 2000. — С. 29–31.
12. Сухіна О.М., Свиаренко А.В., Міхановський О.А., Немальцова О.А., Старенький В.П. Спосіб хрономодульованої хемопроменевої терапії неоперабельних форм раку органів малого таза. Пат. № 66044А UA, МПК⁷ А61N5/10. — З. № 2003076666; Заявл. 15.07.2003; Опубл. 15.04.2004.
13. *Electron Microscopy in Biology. A Practical Approach.* Ed. by Harris J.R. — Oxford University Press, 1991. — P. 308.
14. Лукашова О.П., Міхановський О.А. // *УРЖ.* — 2007. — Т. XV, вип. 3. — С. 344–351.

Надходження до редакції 19.03.2008.

Прийнято 06.05.2008.

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