

ОРИГІНАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

Сегеда Тетяна Валеріївна,
Пасюга Володимир Миколайович,
Гусакова Валерія Антонівна,
Мітряєва Наталія Андріївна

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

Морфологічна оцінка апоптозу та вмісту цераміду в карциномі Герена у щурів при поєднаній дії іонізуючого випромінювання та етопозиду

Morphological assessment of apoptosis and ceramide content in Guerin's carcinoma in rats at combined effects of ionizing radiation and Etoposide

Цель работы: Морфологический анализ апоптоза и уровня проапоптозного липида церамид (ЦМ) в карциноме Герена крыс при совместном действии ионизирующей радиации и этопозид.

Материалы и методы: В качестве экспериментальной модели использовали крыс популяции Вистар с массой тела 160–180 г с подкожно перевитой аденокарциномой Герена. Облучение зоны роста опухоли проводили на аппаратах РУМ (рентгеновское излучение) и на линейном ускорителе Clinac 600 C (высокоэнергетическое фотонное излучение (ВЭФ)) при стандартных технических условиях, фракционировано, с интервалом между сеансами 24 часа, с поглощенной дозой на фракцию 5 Гр, суммарно 10 Гр. Противоопухолевый препарат этопозид («Эбеве») вводили внутривентриально за 24 ч до первого сеанса облучения в дозе 8 мг/кг массы тела. Декапитация проводилась спустя 24 часа после последнего сеанса облучения. Экстракция липидов осуществлялась по методу Фолча. Липиды проявляли в парах йода и сравнивали со стандартами церамид (Sigma). Результат выражали в нмоль/мг белка. Его содержание в исследуемых пробах определялось методом Лоури. Срезы экспериментальных опухолей толщиной 8–10 мкм депарафинировали и окрашивали гематоксилин-эозином в соответствии с методическими рекомендациями. Препараты были изучены и сфотографированы с применением микроскопа Axiolab-Zeiss (Germany). При помощи флуоресцентного микроскопа подсчитывалось количество клеток с характерной для апоптоза морфологией. Результаты выражали в процентном отношении клеток с флуоресцентными фрагментами ДНК апоптотически измененных клеток на 100 исследуемых опухолевых клеток в поле зрения. Статистический анализ проводился с помощью программ ПК Biostat и Statistica при использовании параметрических и непараметрических методов для малых выборок.

Результаты: Показано, что при совместном действии ионизирующего излучения (ИИ) и этопозид происходит значительное увеличение индекса апоптоза в ткани опухоли: в 10,8 раза при действии рентгеновского излучения и в 10,2 при действии ВЭФ излучения, по сравнению с контролем, также в 8,2 и в 6,2 раза по сравнению с облучением, проведенным отдельно. Совместное действие ИИ и этопозид повышает содержание ЦМ в карциноме Герена в 7,9 раза при действии рентгеновского излучения, в 7,0 — при действии ВЭФ излучения относительно контроля и в 5,8 и в 5,0 раза по сравнению с группой, которая только облучалась.

Выводы: Установлено, что совместное действие ИИ разного энергетического диапазона и этопозид приводит к стимуляции процессов апоптоза в ткани опухоли Герена.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, этопозид, индекс апоптоза, церамид.

Objective. Morphological analysis of apoptosis and proapoptotic lipid ceramide (CM) levels in rats with Guerin's carcinoma at combined action of ionizing radiation and Etoposide.

Material and Methods: Wistar rats weighing 160-180 g subcutaneously inoculated with adenocarcinoma Guerin's adenocarcinoma were used in the experiment. Irradiation of the tumor growth zone was performed using RUM unit (x-rays) and a linear accelerator Clinac 600 C (high-energy photon radiation) using standard specifications, in fractions at 24-hour intervals between the sessions, with absorbed dose of 5 Gy per fraction and total of 10 Gy. Anticancer agent Etoposide (Ebewe) was administered intraperitoneally 24 hours before the first irradiation session at a dose of 8 mg/kg of body weight. Decapitation was performed 24 hours after the last irradiation session. Lipid extraction was performed according to Folch. Lipids were processed by iodine vapor and compared to ceramide standards (Sigma). The findings were expressed as nmol/mg of protein. Its content in the test samples was determined according to Lowry. The slices of experimental tumors with 8-10 μm thickness were deparaffinized and stained with hematoxylin-eosin according to the guidelines. The samples were studied and photographed using Axiolab-Zeiss microscope (Germany). Fluorescence microscopy was used to count the cells with typical apoptotic morphology. The findings were expressed as percentage of cells with fluorescent DNA fragments of apoptotic cells per 100 investigated tumor cells in the field of vision. Statistical analysis was performed using the PC software and Statistica Biostat using parametric and nonparametric methods for small samples.

Results: It was shown that combined action of ionizing radiation (IR) and Etoposide resulted in significant increase in apoptotic index of the tumor tissue: 10.8 times under the action of x-rays and 10.2 times at high-energy photon radiation when compared to the controls, and 8.2 and 6.2 times vs. irradiation only. The combined action of IR and Etoposide increased the content of CM in Guerin's carcinoma 7.9 times at x-ray exposure and in 7 times at exposure to high-energy photon radiation, 5.8 and 5.0 times compared with the group that was irradiated only.

Conclusion: It is shown that combined effect of different energy band IR and Etoposide leads to stimulation of apoptosis in the tissue Guerin's tumor.

Key words: ionizing radiation, Etoposide, apoptosis index, ceramide.

Мета роботи: Морфологічний аналіз апоптозу і рівня проапоптозного ліпиду цераміду (ЦМ) в карциномі Герена щурів при поєднаній дії іонізивної радіації та етопозиду.

Матеріали і методи: Як експериментальну модель використовували щурів популяції Вістар з масою тіла 160–180 г з підшкірно перещепленою аденокарциномою Герена. Зону росту пухлини опромінювали на апаратах РУМ (ікс-випромінювання) і на лінійному прискорювачі Clinac 600 С (високоенергетичне фотонне (ВЕФ) випромінювання) за стандартних технічних умов, фракціоновано, з інтервалом між сеансами 24 години та поглинутою дозою за фракцію 5 Гр, сумарно 10 Гр. Протипухлинний препарат етопозид («Ебеве») вводили внутріочеревинно за 24 год. до першого сеансу опромінювання в дозі 8 мг/кг маси тіла. Декапітацію проводили через 24 години після останнього сеансу опромінювання. Ліпиди екстрагували методом Фолча і проявляли в парах йоду, порівнюючи зі стандартами цераміду (Sigma). Результат визначали в нмоль/мг білка. Його вміст у досліджуваних пробах оцінювали за Лоурі. Зрізи експериментальних пухлин завтовшки 8–10 мкм, депарафінували й забарвлювали гематоксилін-еозином відповідно до методичних рекомендацій.

Препарати вивчено і сфотографовано із застосуванням мікроскопа Axiolab-Zeiss (Germany). За допомогою флуоресцентного мікроскопа підраховували кількість клітин з характерною для апоптозу морфологією. Результати наводили в відсотковому відношенні клітин з флуоресцентними фрагментами ДНК апоптично змінених клітин на 100 досліджуваних пухлинних клітин у полі зору. Статистичний аналіз проводили за допомогою програм для ПК Biostat і Statistica при використанні параметричних і непараметричних методів для малих вибірок.

Результати: Показано, що при поєднаній дії іонізивного випромінювання (ІВ) і етопозиду відбувається значне збільшення індексу апоптозу в тканині пухлини: у 10,8 разу за дії ікс-випромінювання і в 10,2 — при дії ВЕФ опромінювання, порівняно з контролем, також у 8,2 і в 6,2 разу в порівнянні з опромінюванням, проведеним окремо. Поєднана дія ІВ і етопозиду підвищує вміст ЦМ у карциномі Герена в 7,9 разу при дії ікс-опромінювання, в 7,0 — при ВЕФ опромінюванні відносно контролю та в 5,8 і в 5,0 разу, порівняно з групою, яку тільки опромінювали.

Висновки: Встановлено, що при поєднаній дії ІВ різного енергетичного діапазону й етопозиду відбувається стимуляція процесів апоптозу в пухлині Герена.

Ключові слова: іонізивне випромінювання, етопозид, індекс апоптозу, церамід.

Однією з основних причин радіорезистентності пухлини вважають порушення регуляції апоптозу. Відомо, що критичним компонентом сигналіngu в опромінених клітинах є метаболіт сфінголіпідів — церамід (ЦМ), який відіграє центральну роль у регуляції диференціювання клітин, арешті клітинного циклу та бере участь у апоптозі [1].

Саме з порушенням у злоякісних клітинах різних ланок обміну ЦМ пов'язують радіорезистентність пухлин [2, 3]. Одним з перспективних напрямків підвищення ефективності променевої терапії новоутворів вважають використання радіомодифікаторів, дія яких направлена на індукцію проапоптозного ліпиду ЦМ. До таких радіомодифікаторів належить протипухлинний препарат етопозид [4]. Але морфологічна оцінка апоптозу при індукції церамідного шляху за умов поєднаної дії іонізивного випромінювання (ІВ) та етопозиду залишається невизначеною.

Мета дослідження — морфологічний аналіз апоптозу та рівня проапоптозного ліпиду ЦМ у карциномі Герена щурів при поєднаній дії ІВ та етопозиду.

Методика дослідження

Дослідження виконане з використанням підослідних щурів-самиць лінії Вістар з масою тіла 160–180 г. Усі дослідні тварини виконували з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985 р.) і Національних загальних етичних принципів експери-

ментів на тваринах (Україна, 2001 р.). Експеримент починали на 10–12-ту д після перещеплення пухлини, коли діаметр пухлинного вузла досягав 1,5–2,0 см. Коливання середнього об'єму пухлини на момент початку експерименту не перевищувало 10 %. Тварин поділили на 6 груп методом випадкового відбору відносно впливу.

У першій серії експерименту опромінювання пухлини проводили на апараті РУМ-17 (ікс-випромінювання) за стандартних технічних умов: напруга — 190 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри: 0,5 мм Cu плюс 1 мм Al, коефіцієнт розподілу поглинутої дози у повітрі — 0,981 Гр/хв, фокусна відстань 30 см. Опромінювали фракційно при дозі на фракцію 5 Гр, час опромінювання — 4 хв 39 с, інтервал між сеансами 24 год, сумарна доза на зону росту пухлини складала 10 Гр. У другій серії експерименту опромінювання пухлини проводили на лінійному прискорювачі Clinac 600 С (високоенергетичне фотонне (ВЕФ) випромінювання) виконували двома фракціями по 5 Гр, з інтервалом між сеансами 24 год, сумарна поглинута доза на зону росту пухлини складала 10 Гр. Clinac 600 С — енергія фотонів 6 МеВ, потужність дози 400 МОд/хв, розмір поля 5 × 5 см, глибина 1 см. Розрахункова кількість моніторних одиниць для опромінювання пухлини Герена в дозі 5 Гр дорівнювала 515. Хемопрепарат етопозид «Ебеве» фірми «Тева» вводили внутріочеревинно за 24 год до першого сеансу опромінювання у дозі 8 мг/кг маси тіла. Тварин знеживлювали через 24 год після опромінювання або введення препарату.

Для світлооптичного мікроскопічного дослідження експериментальних пухлин їх фрагменти було зафіксовано у 10 % нейтральному формаліні, зневоднено у спиртах зростаючої концентрації, проведено через ксилол-парафін, залито у парафін. Зрізи завтовшки 8–10 мкм, виготовлені на санному мікротомі, депарафінували і забарвлювали гематоксилін-еозином відповідно до методичних рекомендацій [5]. Препарати вивчені та сфотографовані з використанням мікроскопа Axiolab-Zeiss (Germany) та електронного окуляра HDCE-30c Electronic Eyepiece (China). За допомогою програми AxioVision 4.8 визначали ядерно-цитоплазматичне відношення за формулою: Я-ц відн. = Сядр./Сцит. [6]. Для виявлення оптичних клітин досліджуваний матеріал рівномірно наносили на покривне скло. Мазки промивали фосфатносолевим буфером (pH = 7,0) і фіксували 4 % параформальдегідом, забарвлювали протягом 20 хв барвником Hoechst 33342 (5 мкг/мл) при кімнатній температурі. З використанням флуоресцентного мікроскопа підраховували

кількість клітин з характерною для апоптозу морфологією [7]. Результати виражали у відсотковому відношенні клітин з флуоресцентними фрагментами ДНК апоптично змінених клітин на 100 досліджених пухлинних клітин у полі зору.

Для визначення сфінголіпідів у тканині пухлину гомогенізували в H_2O для більш повного руйнування клітин, гомогенат використовували для екстракції ліпідів методом Фолча [8]. Сфінголіпіди розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Россия). Екстракти ліпідів, які використовувались для аналізу сфінголіпідів, випаровували у вакуумі та інкубували 60 хв при температурі 37 °C у середовищі: хлороформ-метанол (1:1, v/v), в яке додавали NaOH (0,1 моль) для гідролізу ацилгліцеринів. Ліпіди знову екстрагували і використовували для розподілу на класи у системі розчинників: хлороформ-етилацетат-ізопропіловий спирт-метанол — 0,25 % KCl (25:25:25:10:9). Ліпіди проявляли в парах йоду, порівнюючи зі стандартами. Для ідентифікації ліпідів використовували стандарти ЦМ (Sigma). Результат виражали в нмоль/мг білка, вміст якого у досліджуваних пробах визначали за Лоурі.

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою статистичних програм для ПК Statistica, version 5 при використанні непараметричних методів для малих вибірок та критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення

Через два тижні після перещеплення в усіх тварин під шкірою стегна спостерігалися вузлуватобугристі новоутвори. При проведенні морфологічних досліджень тканини карциноми Герена у досліджуваних щурів контрольної групи було виявлено, що гістоструктура розвинених пухлин, що утворилися через два тижні після трансплантації суспензії клітин, відповідала характерним особливостям цього штаму експериментальних пухлин.

Мікроскопічно пухлини контрольної групи представлені низькодиференційованою тканиною, що складається з епітелієподібних клітин. При малих збільшеннях мікроскопа на зрізах місцями виявляється залозистоподібна тканина (рисунок 1). Ці утвори складаються з одного шару епітелієподібних клітин з великими ядрами з грудкувато розташованим хроматином і поліморфно витягнутою цитоплазмою (рисунок 2). У клітинах спостерігається порушення ядерно-цитоплазматичного співвідношення, яке складає $0,40 \pm 0,01$. Місцями великі епітелієподібні клітини утворюють різноманітно орієнтовані тяжі, без будь-яких закономірностей будови. Клітини у стані поділу майже не зустрічаються.

У групі тварин, які зазнали на пухлину локального впливу ікс-опромінення у фракціонованому режимі, спостерігалися деякі деструктивні пору-

шення пухлинної тканини, представлена низькодиференційованою тканиною. Подекуди зустрічаються елементи псевдозалозистої тканини (рисунок 3). На деяких ділянках видно певний набряк та спотворення клітин (рисунок 4). Спостерігається підвищення на 27% ядерно-цитоплазматичного співвідношення відносно контролю.

У групі тварин, у яких пухлини були піддані ВЕФ опроміненню, мікроскопічно клітини новоутвору не дуже відрізнялися від тих, що зазнали ікс-опромінення. Пухлина була представлена великими епітелієподібними клітинами. Цитоплазма клітин була виражено еозинофільною, з порушенням ядерно-цитоплазматичним співвідношенням. Клітини у стані поділу майже не зустрічалися. Траплялося багато ділянок з дрібними клітинами, зокрема, з майже повною відсутністю цитоплазми та фрагментованими ядрами (рисунок 5). Спостерігається підвищення на 25% ядерно-цитоплазматичного співвідношення відносно контролю.

Таким чином, вивчення гістоструктури тканини пухлини після впливу ІВ різного енергетичного діапазону, свідчить про незначний вплив ІВ на апоптичні процеси в пухлині Герена, що вказує на радіорезистентність останньої.

Морфологічні дослідження пухлин піддослідних груп щурів, яким вводили хемо препарат етопозид, виявили певні порушення гістоструктури пухлинної тканини під його впливом.

У тканині пухлин при введенні етопозиду спостерігалися більш виражені прояви загибелі клітин, ніж у групі, яку опромінювали. Тканина представлена дисоційованими клітинами (рисунок 6). На деяких ділянках спостерігається підвищення кількості великих епітелієподібних клітин з конденсованим хроматином (рисунок 7). Спостерігається поява великої кількості клітин, що перебувають на пізніх стадіях апоптозу: цитоплазма майже повністю відсутня, щільна конденсація хроматину, фрагментація ядер (рисунок 8); має місце підвищення на 50% ядерно-цитоплазматичного співвідношення відносно контролю.

Отже, морфологічні дослідження пухлини Герена через 24 год після застосування етопозиду показали, що процеси апоптозу значно посилювались порівняно з такими у контрольній групі, що підтвердило дослідження індексу апоптозу, який зростав у 3,9 разу (таблиця 1).

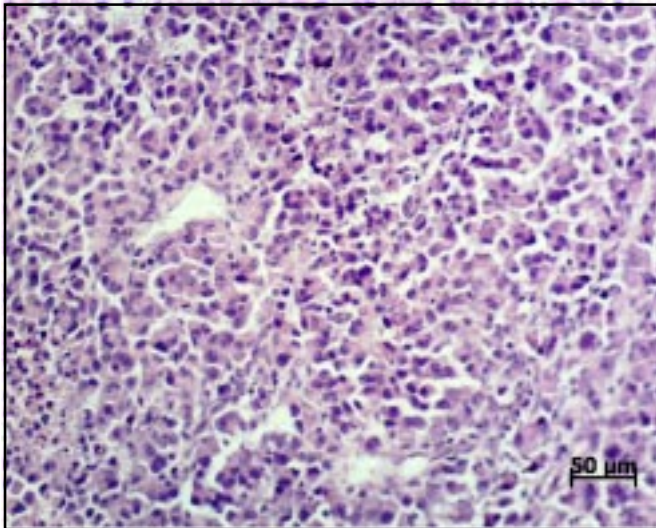


Рисунок 1. Тканина пухлини Герена. Гематоксилін-еозин, $\times 400$

Fig. 1. Guerin's tumor. Hematoxylin and eosin, $\times 400$

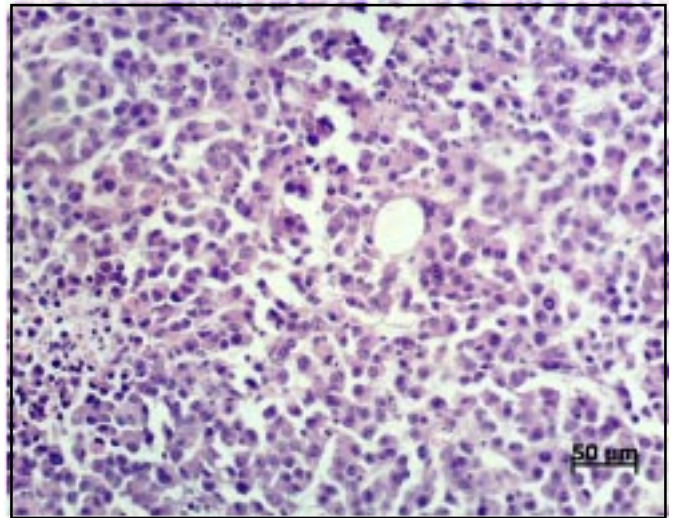


Рисунок 3. Тканина пухлини Герена після ікс-опромінення. Гематоксилін-еозин, $\times 400$

Fig. 3. Guerin's tumor after x-ray exposure. Hematoxylin and eosin, $\times 400$

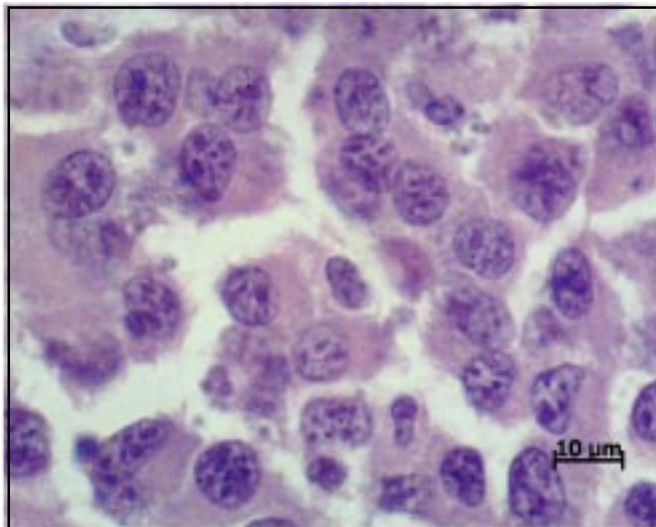


Рисунок 2. Епітелієподібні клітини з конденсованим хроматином. Гематоксилін-еозин, масляна імерсія, $\times 2000$

Fig. 2. Epithelioid cells with condensed chromatin. Hematoxylin and eosin, oil immersion, $\times 2000$

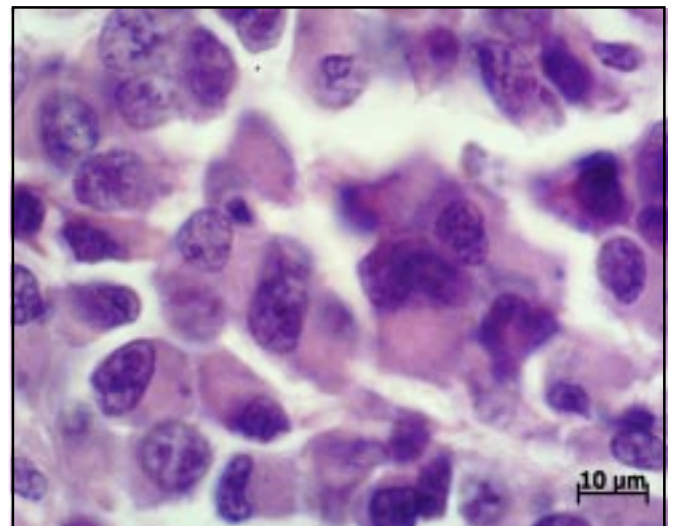


Рисунок 4. Клітини з набрякною цитоплазмою та конденсованим хроматином. Гематоксилін-еозин, масляна імерсія, $\times 2000$

Fig. 4. Cells with swollen cytoplasm and condensed chromatin. Hematoxylin and eosin, oil immersion, $\times 2000$

Після застосування етопозиду в поєднанні з ікс-опроміненням ефект був найбільш вираженим. Тканина представлена набряклими клітинами зі значними деструктивними змінами (рисунок 9). Спостерігаються значні деструктивні зміни у стані клітин: їх велика частина представлена лише ядром (рисунок 10), ядра деяких клітин мають порушення ядерної оболонки, багато клітин із фрагментованими ядрами (рисунок 11). Ядерно-цитоплазматичне співвідношення відносно контролю підвищене на 66%.

При дії ВЕФ випромінювання у поєднанні з етопозидом у тканині пухлин виявляється багато ядер

з конденсованим хроматином та порушеними ядерними оболонками. В окремих полях зору привертає увагу наявність темних базофільних апоптозних тілець серед еозинофільних залишків цитоплазми пухлинних клітин (рисунок 12). Спостерігається підвищення на 60% ядерно-цитоплазматичного співвідношення відносно контролю.

Отже, при комбінованій дії етопозиду та ІВ на карциному Герена посилюються деструктивні зміни пухлинних клітин, а саме: збільшується кількість ядер з конденсованим та фрагментованим хроматином, порушуються ядерні оболонки.

Таблиця 1

Індекс апоптозу в пухлині Герена після впливу поєднаної дії іонізуючого випромінювання та етопозиду, %
Apoptosis index in Guerin's tumor after exposure to combined effects of ionizing radiation and Etoposide, %

Вплив	Кількість полів зору, n	Індекс апоптозу, %
Контроль (пухлина)	42	2,5
Ікс-випромінювання	15	3,3
ВЕФ випромінювання	27	4,1
Етопозид	42	9,8*
Ікс-випромінювання + етопозид	15	27,2*/#
ВЕФ випромінювання + етопозид	27	25,6*/#

Примітка. Вірогідність різниці відносно: * – контрольної групи, $p < 0,05$; # – опромінення, $p < 0,05$.

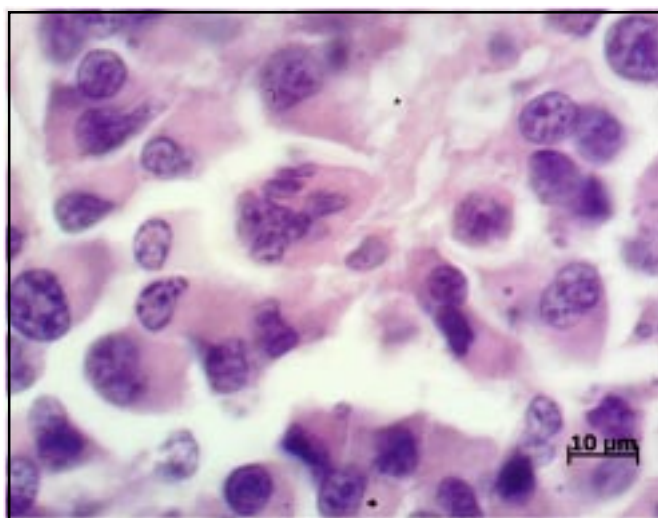


Рисунок 5. Спотворені ядра клітин пухлини Герена тварин, опроміненіх ВЕФ випромінюванням. Гематоксилін-еозин, масляна імерсія, $\times 2000$

Fig. 5. Distorted nuclei of Guerin's tumor cells in animals exposed to high-energy photon radiation. Hematoxylin and eosin, oil immersion, $\times 2000$

ки, що характерно для апоптичної загибелі клітин. Поєднання етопозиду та ІВ призводить до значного підвищення індексу апоптозу в 10,8 разу при дії рентгенівського, та в 10,2 при дії ВЕФ випромінювання порівняно з контрольною, та в 8,2 і в 6,2 разу відповідно порівняно з опроміненням, проведеним окремо, та в 2,7 і 2,6 разу — порівняно з групами, де вводився тільки хемопрепарат етопозид (див. таблицю 1).

Дослідження ядерно-цитоплазматичного відношення показало, що ІВ, введення етопозиду і комбінована дія ІВ та етопозиду призводять до підвищення цього показника в 1,5 разу порівняно з контролем (таблиця 2). Збільшення такого відношення може свідчити про можливий початок

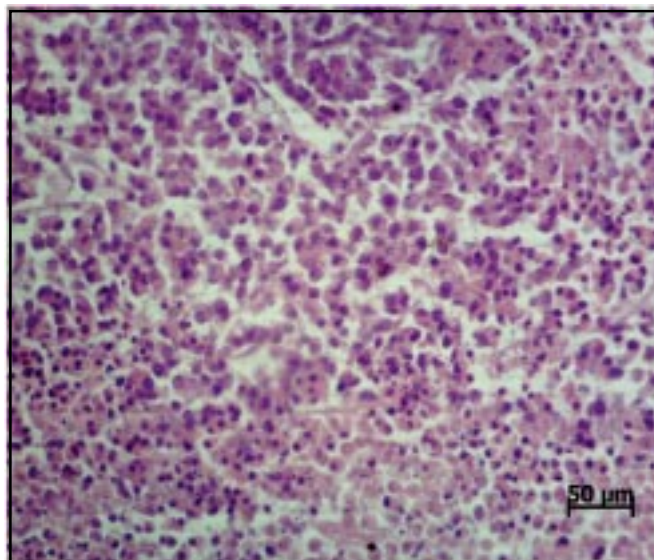


Рисунок 6. Тканина пухлини Герена після введення етопозиду. Гематоксилін-еозин, $\times 400$

Fig. 6. Guerin's tumor tissue after administration of Etoposide. Hematoxylin and eosin, $\times 400$

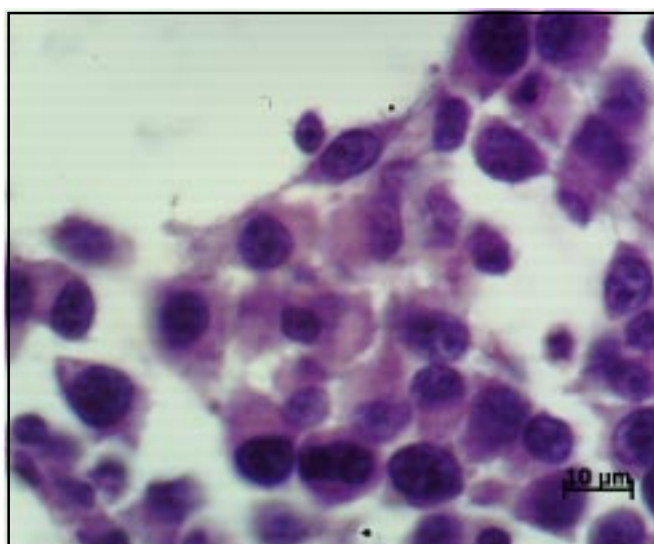


Рисунок 7. Клітини із щільно конденсованим хроматином. Гематоксилін-еозин, масляна імерсія, $\times 2000$

Fig. 7. Cells with tightly condensed chromatin. Hematoxylin and eosin, oil immersion, $\times 2000$

процесу апоптозу у клітинах, що відповідає результатам інших дослідників [9, 10]

Дослідження вмісту проапоптозного ліпиду — ЦМ у пухлині показали, що його рівень під впливом ІВ різного енергетичного діапазону вірогідно не змінювався відносно контрольної групи (таблиці 3, 4).

Зміни рівня індексу апоптозу в тканині пухлини Герена корелювали зі змінами рівня проапоптозного ліпиду ЦМ при поєднаній дії ІВ та етопозиду. Порівняно з контролем рівень ЦМ підвищувався в 7,9 разу при дії ікс-випромінювання, і в 7,0 —

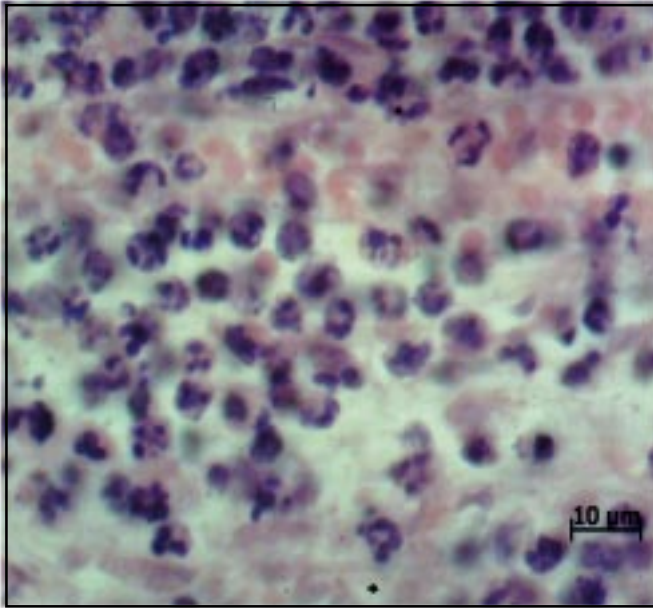


Рисунок 8. Клітини пухлини Герена з елементами апоптозу. Гематоксилін-еозин, масляна імерсія, $\times 2000$

Fig. 8. Guerin's tumor cells with elements of apoptosis. Hematoxylin and eosin, oil immersion, $\times 2000$

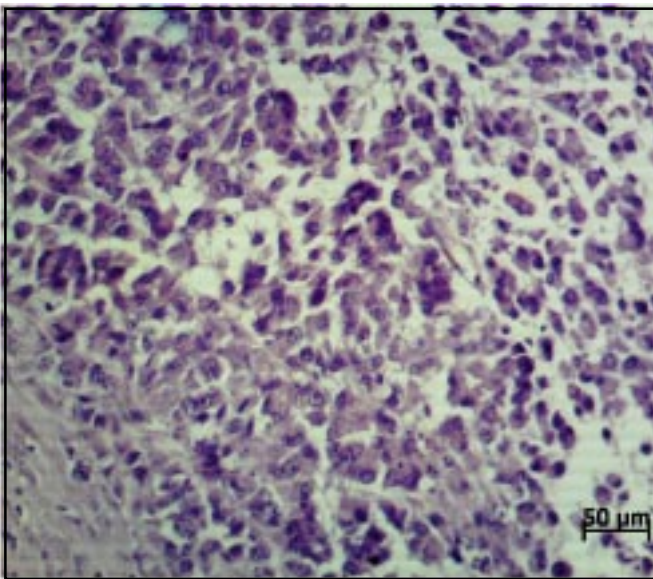


Рисунок 9. Тканина пухлини Герена зі значними деструктивними змінами. Гематоксилін-еозин, $\times 400$

Fig. 9. Guerin's tumor with significant destructive changes. Hematoxylin and eosin, $\times 400$

при ВЕФ опроміненні, порівняно з опроміненням, що здійснювалось окремо, в 5,8 і в 5,0 разу відповідно (див. таблиці 3, 4).

Отримані дані про суттєве підвищення ЦМ у тканині пухлини Герена під дією етопозиду та його комбінованого застосування з ІВ узгоджуються з даними інших дослідників у цій галузі [11].

Таким чином, проведені дослідження показали наявність зв'язку між морфологічними показниками апоптозу та рівнем проапоптозного ліпиду

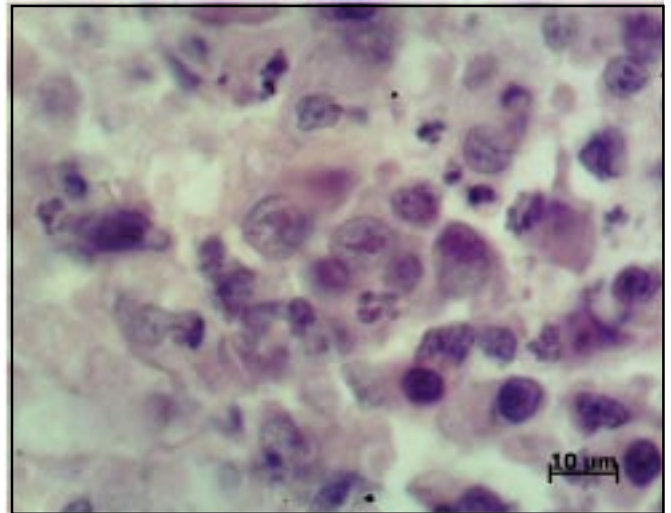


Рисунок 10. Клітини з деструктивними змінами. Гематоксилін-еозин, масляна імерсія, $\times 2000$

Fig. 10. Cells with destructive changes. Hematoxylin and eosin, oil immersion, $\times 2000$

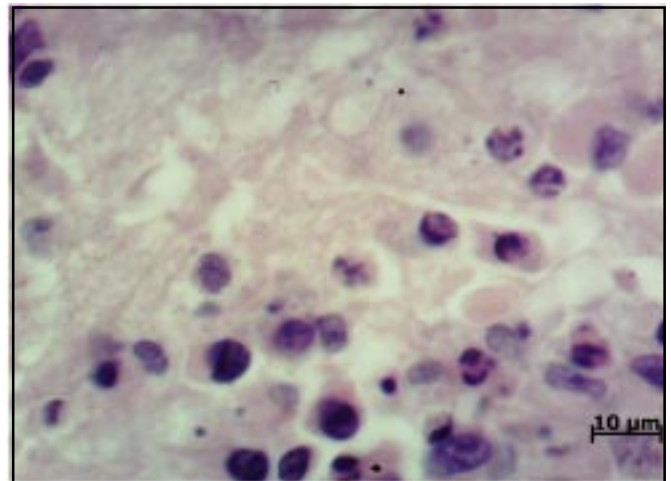


Рисунок 11. Клітини пухлини Герена з елементами апоптозу. Гематоксилін-еозин, масляна імерсія, $\times 2000$

Fig. 11. Guerin's tumor cells with elements of apoptosis. Hematoxylin and eosin, oil immersion, $\times 2000$

ЦМ у пухлині Герена. Це дозволяє дійти висновку, що при поєднаній дії ікс- або ВЕФ випромінювання та етопозиду значно підвищується рівень проапоптозного ліпиду ЦМ, та стають морфологічно більш вираженими деструктивні зміни у пухлині, зростає індекс апоптозу, порівняно з окремою дією кожного із зазначених факторів, а також з контрольною групою.

Висновки

1. Поєднана дія ІВ та етопозиду призводить до значного підвищення індексу апоптозу в тканині пухлини в 10,8 разу при дії ікс-випромінювання та в 10,2 — при дії ВЕФ випромінювання порівняно з

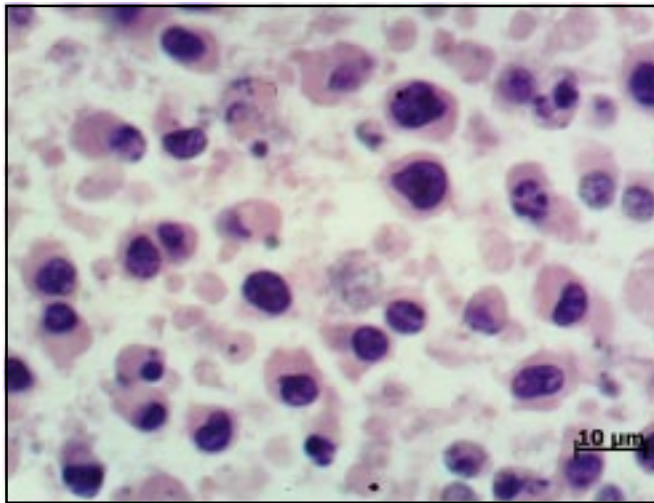


Рисунок 12. Клітини пухлини Герена з елементами апоптозу. Гематоксилін-еозин, масляна імерсія, $\times 2000$

Fig. 12. Guerin's tumor cells with elements of apoptosis. Hematoxylin and eosin, oil immersion, $\times 2000$

Таблиця 2

Ядерно-цитоплазматичне відношення у клітинах пухлини Герена після впливу поєднаної дії ІВ та етопозиду, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)
Nuclear-cytoplasmic ratio in Guerin's tumor cells after exposure to combined effects of IR and Etoposide, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

Вплив	Кількість клітин	Ядерно-цитоплазматичне відношення
Контроль (пухлина)	100	0,40 \pm 0,01
Етопозид	100	0,50 \pm 0,01*
Рентгеновське випромінювання (РУМ 17)	100	0,50 \pm 0,01*
Високоенергетичне фотонне випромінювання (Сінас 600 С)	100	0,60 \pm 0,01*
Опромінення (РУМ 17)+ етопозид	100	0,66 \pm 0,01*
Опромінення (Сінас 600 С)+ етопозид	100	0,63 \pm 0,01*

Примітка. * — вірогідність різниці відносно контрольної групи, $p < 0,05$.

Таблиця 3

Вплив поєднаної дії ікс-випромінювання та етопозиду на вміст цераміду в карциномі Герена, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)
The effect of combined x-ray exposure and Etoposide on ceramide content in Guerin's carcinoma, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

Вплив	n	Церамід, нмоль/мг білка
Контроль (пухлина)	5	3,18 \pm 0,29
Етопозид	5	14,65 \pm 2,41*
Опромінення	5	4,37 \pm 0,74
Опромінення + етопозид	5	25,19 \pm 2,91*/#

Примітка. Вірогідність різниці відносно: * — контрольної групи, $p < 0,05$; # — опромінення, $p < 0,05$.

Таблиця 4

Вплив поєднаної дії ВЕФ випромінювання та етопозиду на вміст цераміду в карциномі Герена, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)
The effect of combined exposure to high-energy photon radiation and Etoposide on ceramide content in Guerin's carcinoma, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

Вплив	n	Церамід, нмоль/мг білка
Контроль (пухлина)	9	3,24 \pm 0,31
Етопозид	9	14,83 \pm 2,90*
Опромінення	9	4,48 \pm 0,92
Опромінення + етопозид	9	22,69 \pm 2,95*/#

Примітка. Вірогідність різниці відносно: * — контрольної групи, $p < 0,05$; # — опромінення, $p < 0,05$.

контрольною, а також у 8,2 і в 6,2 рази порівняно з опроміненням, проведеним окремо.

2. Застосування ІВ в поєднанні з етопозидом вірогідно підвищує вміст проапоптозного ліпиду цераміду в карциномі Герена в 7,9 рази при дії ікс-випромінювання, та в 7,0 — при ВЕФ випроміненні відносно контрольної групи, та в 5,8 і в 5,0 рази порівняно з опроміненням, що здійснювалось окремо.

Література

1. Carpinteiro A., Dumitru C., Schenck M., Gulbins E. // *Cancer Letters*. – 2008. – Vol. 264, № 1. – P. 1–10.
2. Reynolds C.P., Maurer B.J., Kolesnik R.N. // *Ibid.* – 2004. – Vol. 206. – P. 169–180.
3. Smit E.L., Edward H. Schuchman // *Te FASEB J.* – 2008. – Vol. 22. – P. 3419–3431.
4. Modrak D. E., Gold D. V., Goldenberg D. M. // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – Vol. 5. – P. 200–208.
5. Матвієнко А. В. Морфологічні дослідження на етапі доклінічного вивчення лікарських засобів: Метод. рекомендації / Укл. А. В. Матвієнко, Л. В. Степанова. - К., 2001. - С. 19.
6. Mahanta L. B., Bora K. // *Int. J. Adv. Res. Comp. Sci. Soft. Eng.* – 2012. – Is. 11 – P. 341–346.
7. Allen S., Sotos J., Sytle M. et al. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2001. – Vol. 8, № 2. – P. 460–464.
8. Folch J., Lees M., Stanley G. // *J. Biol. Chem.* – 1957. – Vol. 226. – P. 497–509.
9. Ketabchi A., MacRobert A., Speight P. M., Bennett J. H. // *Archives of Oral. Biol.* – 1998. – № 43. – P. 143–149.
10. Charles D. Sturgis, Diana L. Nassar, Joyce A. D'Antonio et al. // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2000. – Vol. 114. – P. 197–202.
11. Ogretmen B. // *FEBS Lett.* – 2006. – Vol. 580. – P. 5467–5476.

Надходження до редакції 25.02.2014.

Прийнято 21.03.2014.

Адреса для листування:
Сегеда Тетяна Валеріївна,
ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України»,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна