

КЛІНІЧНАЯ І ЭКСПЕРЫМЕНТАЛЬНАЯ МЕДЫЦЫНА

УДК 616.24-006.6-0.85.356.164.1-091-092.9

*Ю. Е. ДЕМИДЧИК, Т. Е. ВЛАДИМИРСКАЯ, Г. В. ШЕРСТЮК,
В. М. БЫЧКОВ, С. И. СТАНКЕВИЧ*

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС ПРИ КОРРЕКЦИИ КОНКУРЕНТАМИ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

*Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск,
e-mail: yu. demidchik@gmail.com*

(Поступила в редакцию 13.02.2015)

Введение. Онкологическая патология занимает второе место после заболеваний сердечно-сосудистой системы в структуре причин смертности населения [1]. Поиск средств борьбы с онкозаболеваниями и оптимальных методов лечения продолжает оставаться одной из актуальных задач медицины [2]. В последнее десятилетие при поиске и разработке противораковых химиотерапевтических средств интенсивно используется стратегия эпигенетического вмешательства в регуляцию экспрессии генов опухолевых клеток. Концепция основана на результатах работ, продемонстрировавших заметное изменение дифференцированного состояния клеток культуры, сопровождаемое резким снижением метилирования вновь синтезируемых клеточных ДНК.

Нарушения характера метилирования проявляются при самых различных злокачественных новообразованиях. Одним из широко распространенных проявлений подобных патологических процессов является гиперметилирование промоторов генов белков подавления опухоли, ведущее к подавлению экспрессии этих генов [3–4].

Фолиевая кислота (ФК), являющаяся неотъемлемым компонентом клеточного метаболизма и жизнедеятельности организма, необходима при синтезе и репликации ДНК, а также при росте, делении и выживании клеток. У многих типов опухолевых клеток наблюдается повышенная экспрессия рецепторов ФК, реализующих ее рецептор-опосредованный перенос в цитозоль из межклеточной среды, а производные ФК являются основными донорами метильных групп, которые необходимы при метилтрансферазных реакциях постмитотического импринтинга в клетках. Исходя из изложенных выше свойств одного из ключевых агентов клеточного метаболизма ФК, нами сделан акцент на изучение эпигенетического противоопухолевого действия препаратов, способных конкурировать с ФК в процессах клеточного метаболизма. Из множества таких соединений нами выбраны 3-(пара-аминобензол-сульфамидо)-5-метилизоксазол и 2,4-диамино-5-(3,4,5-метоксибензил)-пиримидин. Их потенциальная способность конкурировать с ФК определяется тем, что первое является производным аналогом парааминобензойной кислоты, составной части молекулы ФК, а второе давно известно как антагонист (антиметаболит) ФК [5].

Особый интерес представляет динамика патоморфологических изменений в ткани экспериментальных новообразований при использовании данных препаратов.

Одной из экспериментальных моделей злокачественных опухолей является карцинома Льюиса, которая избирательно метастазирует в легкие [6].

Цель исследования – изучить динамику патоморфологических изменений в тканях первичной опухоли и метастазов перевиваемой карциномы легкого Льюис при коррекции 3-(пара-аминобензол-сульфамидо)-5-метилизоксазолом и 2,4-диамино-5-(3,4,5-метоксибензил)-пиримидином.

Материалы и методы исследования. Экспериментальная часть выполнялась на базе ИБОХ НАН Беларуси в стандартных условиях вивария. Животные содержались в комнате барьерного типа при 12-часовом световом режиме, в условиях свободного доступа к воде и пище, в контролируемых условиях окружающей среды (18–26 °С). При проведении экспериментальных исследований руководствовались методическими указаниями «Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)» (Руководящий нормативный документ РД-126–91. М., 1992).

Опыты проведены на 35 мышах-самцах линии С57Вl/6j (масса тела 22–28 г, возраст 3,0–3,5 мес.). Суспензию клеток карциномы Льюис (80 тыс. клеток в растворе Хенкса) перевивали внутримышечно в область бедра. Животные были распределены на три группы. Дизайн исследований представлен в таблице.

Дизайн исследований

Группа	К-во животных	Схема введения препаратов
1 (контроль)	15	Введение 80 тыс. клеток карциномы Льюис внутримышечно
2	10	Начиная со вторых суток после имплантации опухолевых клеток в течение 22 сут в опухоль комплексно вводили (через день) 3-(пара-аминобензол-сульфамидо)-5-метилизоксазол и 2,4-диамино-5-(3,4,5-метоксибензил)-пиримидин в дозах 320 и 64 мг/кг соответственно
3	10	Начиная со вторых суток после имплантации опухолевых клеток в течение 22 сут в здоровую лапу комплексно вводили (через день) 3-(пара-аминобензол-сульфамидо)-5-метилизоксазол и 2,4-диамино-5-(3,4,5-метоксибензил)-пиримидин в дозах 320 и 64 мг/кг соответственно

Начиная со вторых суток после имплантации опухолевых клеток в опухоль (локальное воздействие) или в здоровую лапу (обширное воздействие) через день комплексно вводили 3-(пара-аминобензол-сульфамидо)-5-метилизоксазол и 2,4-диамино-5-(3,4,5-метоксибензил)-пиримидин, как конкуренты ФК, в дозах 320 и 64 мг/кг соответственно.

По окончании эксперимента (на 24-е сутки) животных подвергали эвтаназии.

Для гистологического исследования забирались первичная опухоль и метастазы в легких мышей с инокулированной опухолью Льюис. Из образцов тканей готовили парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином и по Фельгену на содержание ДНК [7]. Митотическую активность оценивали путем подсчета количества митозов в 10 полях зрения (×400), что практически охватывало большую часть площади среза экспериментальной опухоли.

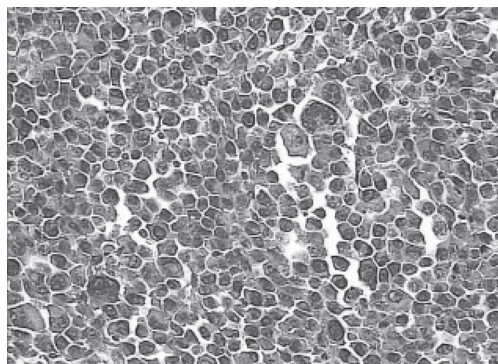


Рис. 1. Крупные ядра, занимающие до 2/3 объема клетки, ядерный полиморфизм и атипизм, многоядерные клетки. Дистрофические изменения минимальны. Окраска гематоксилином и эозином. ×400

Дальнейшее изучение микропрепаратов и изготовление микрофотографий осуществляли с помощью микроскопов Leica DMLS и Axio Imager (Германия). Во всех случаях применялась обзорная микроскопия.

Результаты и их обсуждение. Патоморфологическая характеристика карциномы легкого Льюис (группа 1, контроль).

Опухоль. У животных всех экспериментальных групп в месте имплантации суспензии клеток развивались опухолевые узлы карциномы Льюис.

При микроскопическом исследовании карцинома Льюис в микропрепаратах животных контрольной группы имеет характерное гистоеидное строение в виде тесно лежащих полигональных клеток с узким ободком гомогенной эозинофильной цитоплазмы и крупным ядром, занимающим до 2/3 объема клетки (рис. 1). Кон-

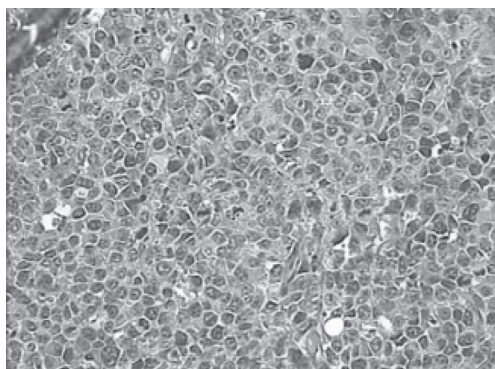


Рис. 2. Гистоидное строение опухоли, 7 митозов в поле зрения. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

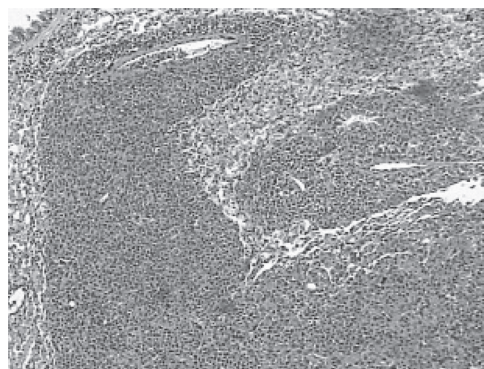


Рис. 3. Центральная зона опухоли с микроочагами некроза. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

туры ядра четкие, ровные, хроматин мелкодисперсный, локализуется по периферии ядра. Цитоплазма имеет вид четко контурируемого ободка. В каждом поле зрения определяется не менее 4–5 митозов (рис. 2). Центральные расположенные ядра содержат 1–2 крупных округлых ядрышка. Отмечаются опухолевые клетки с грубоглыбчатой конденсацией хроматина и многоядерные клетки, что соответствует принципу ядерного атипизма и полиморфизма как проявлению катаплазии и опухолевой прогрессии. Иногда прослеживаются единичные пикнотичные ядра и апоптотические тела. По периферии опухоли на границе с мышечной тканью на фоне умеренного отека с незначительной лимфо-гистиоцитарной инфильтрацией отмечается разрастание сосудов сунусоидального типа. В центральной зоне опухоли зачастую наблюдаются фокусы некроза от микроочагов до 20–30 % площади всей опухоли. Причем очаги некроза не локализируются по периферии опухоли, где достаточно выражена васкуляризация, а располагаются в центральной бессосудистой зоне (рис. 3). Отсюда следует, что их возникновение связано в первую очередь с неполноценным кровоснабжением и ишемическим механизмом повреждения.

Метастазы. В легких мышей контрольной группы во всех случаях отмечается до 3–6 метастазов диаметром 0,1–2 мм, перифокальная реакция вокруг них не выявляется. Гисто-цитологическая характеристика опухолевых клеток в метастазах идентична таковой в опухоли на бедре, т. е. наблюдаются солидно-гистоидное строение, высокая митотическая активность, гиперхромия, ядерный полиморфизм и атипизм. Признаков некроза и выраженной дистрофии в метастазах не выявлено. Лишь у одной мыши при больших размерах метастаза (до 3 мм) отмечен центральный некроз, что можно объяснить неадекватным кровоснабжением в очаге. Реакция по Фельгену выявляет ДНК в ядрах в виде гомогенной субстанции выраженного пурпурного цвета одинаковой степени интенсивности как на бедре, так и в легочных метастазах.

Некроз в опухолях контрольной группы мелкоочаговый, мозаичный, что связано с ишемией центральной зоны, где отмечается минимальное количество сосудов.

Характеризуя в целом контрольную группу, следует подчеркнуть, что определяющими в гисто-цитологической картине являются гиперхромия ядер, высокий ядерно-цитоплазматический индекс, высокая митотическая активность, наличие 1–2 ядрышек при относительной мономорфности самих опухолевых клеток. Дистрофические изменения опухолевых клеток вне зоны центрального некроза не выражены. Практически отсутствует лимфоидный компонент в инфильтрации, что может свидетельствовать о невыраженности местного иммунного ответа со стороны окружающих тканей.

Патоморфологическая картина карциномы легкого Льюис при локальном воздействии 3-(пара-аминобензол-сульфамидо)-5-метилизоксазола и 2,4-диамино-5-(3,4,5-метоксибензил)-пиримидина на опухоль (группа 2).

Опухоль. Определяющим в морфологии животных экспериментальной группы 2 является высокая степень выраженности некроза, который занимает от 60 до 90 % от всей площади среза опухоли. Причем некроз носит не мозаичный характер, как в контрольной группе, а имеет вид

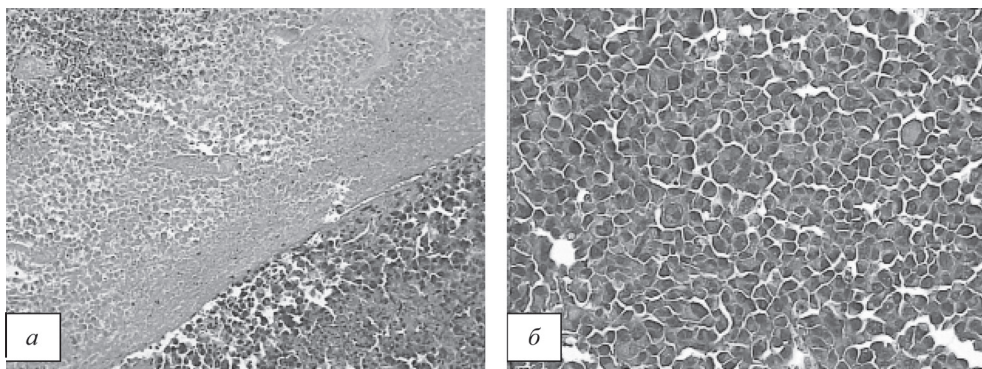


Рис. 4. Морфологическая картина ткани первичной опухоли мышей экспериментальной группы 2: *а* – субтотальный некроз и выраженные дистрофические и некробиотические изменения клеток после введения препарата (окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$); *б* – уменьшение ядерно-цитоплазматического соотношения, цитоплазматические вакуоли, уменьшение количества митозов в поле зрения (окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$)

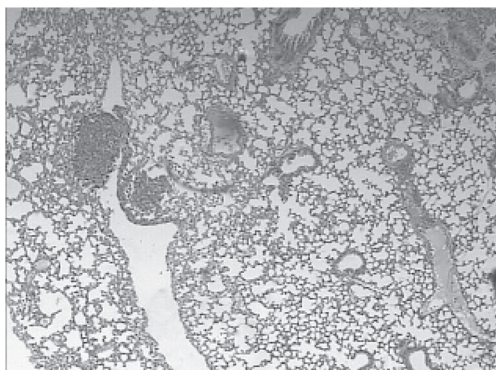


Рис. 5. Единичные метастазы в легком в группе животных после применения препарата. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 50$

сплошного субтотального некроза, распространяясь до периферической зоны опухоли, где имеет место высокая степень васкуляризации (рис. 4, *а*).

В сохранившихся опухолевых клетках наблюдаются очаговое просветление цитоплазмы и ядра, цитоллиз, кариопикноз и кариорексис, конденсация хроматина в виде хаотичных крупноглыбчатых структур, отмечаются внутриядерные вакуоли и апоптотические тельца, ядрышки более редки и менее выражены, число митозов сокращается до 2–3 в поле зрения, уменьшается ядерно-цитоплазматическое соотношение (рис. 4, *б*).

Опухолевые клетки лежат менее компактно в результате перичеллюлярного отека.

Метастазы. В легочных метастазах отмечаются не

характерные для животных контрольной группы диффузный некроз и выраженные дистрофические изменения опухолевых клеток, которые могут быть объяснены цитотоксическим действием лекарственного средства. Этот момент представляется принципиально важным, поскольку исключает травматические повреждения иглой при ежедневной инъекции. В легких 6 животных отсутствуют метастазы, у остальных мышей метастазы единичны и меньших размеров (рис. 5). Следует подчеркнуть, что в клетках тканей, окружающих опухоль, не прослеживаются ни дистрофические, ни некротические изменения. Реакция по Фельгену окрашивает ДНК-содержащую субстанцию в ядре менее интенсивно, чем в контрольной группе.

Патоморфологическая картина карциномы легкого Льюис при обширном воздействии 3-(пара-аминобензол-сульфамидо)-5-метилизоксазола и 2,4-диамино-5-(3,4,5-метоксибензил)-пиримидина на опухоль (группа 3).

Опухоль. Животным экспериментальной группы 3 вводили препарат в здоровую лапу. Травматизация иглой опухолевых клеток при ежедневных инъекциях исключалась и не было непосредственного контакта с препаратом.

Морфологическая картина у животных этой группы определялась зоной некроза опухоли, которая составляла от 30 до 80 % поверхности среза, включая периферические участки опухоли с относительно высокой васкуляризацией (рис. 6, *а*).

Цитологические изменения в опухолевых клетках были аналогичны таковым в экспериментальной группе 2: уменьшение числа митозов до 1–2 в поле зрения, конденсация хроматина, цитоллиз, кариорексис, кариопикноз, цитоплазматические вакуоли и внутриядерные включения, уменьшение ядерно-цитоплазматического соотношения (рис. 6, *б*). Реакция по Фельгену демонстрировала более низкое содержание ДНК по сравнению с контролем.

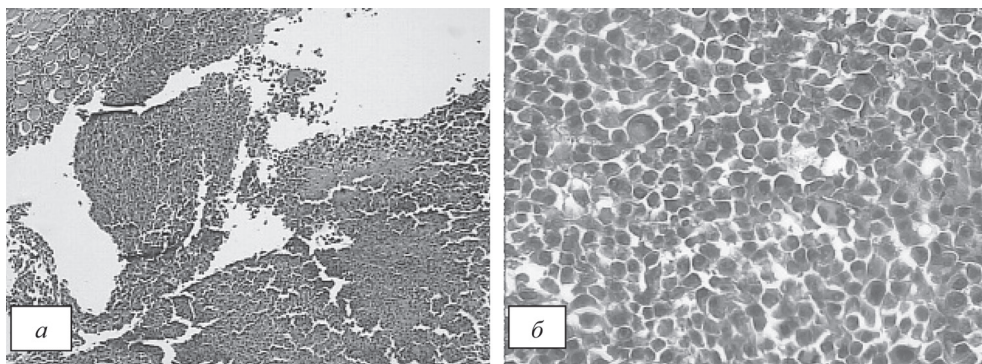


Рис. 6. Морфологическая картина ткани первичной опухоли мышей экспериментальной группы 3: *а* – некроз и дистрофические изменения в периферической зоне опухоли на границе с мышечной тканью, где относительно высока васкуляризация (окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$); *б* – уменьшение числа митозов до 1–2 в поле зрения, внутриядерные включения, кариопикноз и кариорексис, внутриядерные и цитоплазматические вакуоли (окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$)

Метастазы. У 3 мышей из 9 отсутствовали метастазы в легких, а у 6 животных были единичные микрометастазы, причем с выраженными дистрофическими изменениями опухолевых клеток.

Вывод. Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют утверждать, что имеется определенный терапевтический эффект 3-(пара-аминобензол-сульфамидо)-5-метилизоксазола и 2,4-диамино-5-(3,4,5-метоксибензил)-пиримидина на перевиваемую карциному Льюис у экспериментальных животных. Механизм действия обусловлен как цитотоксическим влиянием на опухолевые клетки, так и снижением уровня их пролиферации. Заметного повреждающего эффекта на окружающие неопухолевые клетки не выявлено.

Литература

1. Чиссов В. И. // Мед. вестн. 2010. № 8. С. 41–45.
2. Суконко О. Г. // Онкол. журн. 2011. Т. 5, № 4. С. 5–18.
3. Rutka J. T. // J. Neurooncol. 2009. Vol. 92. P. 261–273.
4. Gronbaek K., Hother C., Jones P. A. // APMIS. 2007. Vol. 115. P. 1039–1059.
5. Польшаков В. И. // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2001. № 4. С. 1652–1669.
6. Софьина З. П., Сыркина А. Б., Голдина А., Кояйна А. М. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов. М., 1979.
7. Сапожников А. Г., Доросевич А. Е. Гистологическая и микроскопическая техника: руководство. Смоленск, 2000.

Yu. E. DEMIDCHIK, T. E. VLADIMIRSKAYA, G. V. SHERSTIUK, V. M. BYCHKOV, S. I. STANKEVICH

PATHOMORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF EXPERIMENTAL LEWIS LUNG CARCINOMA AT CORRECTION BY COMPETITORS OF FOLIC ACID

Summary

When studying the efficiency of impact of folic acid competitors on intertwined Lewis carcinoma in experimental animals, it is established that 3-(couple-aminobenzene-sulfamido)-5-metilizoksazol and 2,4-diamino-5-(3,4,5-metoksibenzyl)-pyrimidine have a certain therapeutic effect. The mechanism of action consists both of the cytotoxic influence on tumor cells and of a decrease in the level of their proliferation. The noticeable damaging effect on surrounding non-neoplastic cells is not registered.