

## Морфометрична характеристика клітин L<sub>929</sub> після термічного та радіаційного впливу

В. А. Барабой, Т. В. Танцюра, Л. С. Коваленко, В. А. Зінченко, Г. Й. Лавренчук

Український науково-дослідний інститут онкології та радіології МОЗ України  
Вул. Ломоносова, 33/43, Київ, 252022, Україна

*В статті за морфометричними показниками (площа клітини, ядра, ядерець) досліджено порівняльний вплив на культуру L<sub>929</sub> фібробластів, трансформованих метилхолантреном, рентгенівського опромінення (15 Гр) та підвищеної температури (40 та 43 °С) порізно та в різній послідовності для відшукування оптимальної схеми терморадіотерапії пухлин. Доведено, що найбільший ступінь деструкції клітин спостерігається при послідовності: гіпертермія (40 або 43 °С) — променеви вплив.*

**Вступ.** Значний ушкоджуючий ефект радіогіпертермії (РГТ) в онкології не викликає сумніву [1—3]. Залишається актуальним дослідження структурних і функціональних змін у клітинах пухлин після застосування комбінованої дії рентгенівського опромінення (РО) і гіпертермії (ГТ) для визначення оптимальних режимів терморадіодеструкції пухлин.

Підвищення температури клітинної маси вище 42 °С призводить до незворотного ушкодження значної частини клітин та посилення уражаючої дії іонізуючого опромінення [4]. Вплив температури, нижчої за 42 °С, не створює істотної протипухлинної дії, але може сенсibilізувати клітини неоплазми до наступного променевого ушкодження. Виходячи з цього в наших схемах комбінованої РГТ, у яких одержано кращі результати, використано послідовність: ГТ + РО [5—7]. Для глибшого розуміння ролі рівня температури, яка впливає на кігцевий ефект девіталізації пухлинних клітин, ми здійснили наступні експерименти в системі *in vitro*.

Дослідження на клітинних культурах становить самостійний інтерес, бо дає змогу досконаліше вивчати клітинні механізми радіорезистентності. Враховуючи, що клітини культури, які знаходяться в стаціонарній фазі росту, є адекватною моделлю солідних пухлин [8], досліди проводили на штам клітин L<sub>929</sub> — класичній тест-культурі.

**Матеріали і методи.** Дослідження виконано на асинхронній культурі трансформованих метилхолантреном фібробластів мишей (лінія L<sub>929</sub>), культивування яких здійснювали на покривних скельцях розміром 5 × 5 мм, що знаходилися на дні пляшечок з-під пеніциліну, зі щільністю посадки 10<sup>6</sup> клітин/мл.

Використовували поживне середовище наступного складу: 40 % середовища 199, рН 7,2, на розчині Хенкса; 40 % гідролізату лактальбуміну; 20 % сироватки крові великої рогатої худоби; 40 мкг гентаміцину на 0,5 мл середовища.

Рентгенівське опромінення клітин, що росли в моношарі, проводили у флаконах на апараті РУМ-17 за таких умов: напруга 180 кВ, сила струму 10 мА, фільтри 0,5 мм Cu + 1,0 мм Al, відстань 25 см, потужність дози 125 Р/хв протягом 12 хв, сумарна доза 15 Гр. Гіпертермію здійснювали в ультратермостаті при температурі 40 та 43 °С протягом 40 хв.

Варіанти комбінованої дії вищезгаданих факторів: 1) опромінення в дозі 15 Гр; 2) гіпертермія 40 °С; 3) гіпертермія 43 °С; 4) гіпертермія 40 °С + опромінення в дозі 15 Гр; 5) опромінення в дозі 15 Гр + гіпертермія 40 °С; 6) гіпертермія 43 °С + опромінення в дозі 15 Гр; 7) опромінення в дозі 15 Гр + гіпертермія 43 °С.

Кількісний аналіз суспензії клітин, які вижили, здійснювали в камері Горяєва на 4-ту добу після впливу факторів шляхом дезагрегації клітин з моношару 0,25 %-м розчином трипсину та дода-

ванням 1—2 крапель 1 %-го розчину трипанового синього. Морфометричний аналіз проводили після фіксації клітин на склі 96° етиловим спиртом і фарбування по Романовському. Дослідження виконували на цитоаналізаторі «Інтеграл 2 МТ» («Квант», Київ) у режимі «контур» з виміром 50 клітин. Аналізували такі показники, як площа клітин, ядер та ядерець.

Статистичну обробку здійснювали за допомогою методу Ст'юдента.

**Результати та обговорення.** В інтактному контролі клітини культури L<sub>929</sub> утворюють щільний моношар, побудований з типових фібробластоподібних клітин веретеновидної, округлої або овальної форми. Площа проекції клітин варіює від 250 до 750 мкм<sup>2</sup> (рис. 1, а). Більшість клітин має два відростки. Цитоплазмі цих клітин притаманні світлі вакуолі та маленькі гранули. Ядра клітин відносно великі, зустрічаються окремі двоядерні, а також гіперхромні клітини. Ядерця мають розмір від 5 до 10 мкм<sup>2</sup>. У полі зору спостерігаються 2—3 клітини на стадії поділу.

Після впливу рентгенівського опромінення в дозі 15 Гр відмічено зменшення щільності моношару, клітини на склі розташовані окремими групами. Отже, проліферативна активність клітин L<sub>929</sub> у

культурі і синтез РНК після опромінення пригнічуються (на останнє вказує зменшення кількості ядерець). Ступінь деструкції великий, з'являються дистрофічні й некротичні зміни. Більшість клітин має округлу або полігональну форму, кількість веретеноподібних клітин зменшується. Гетерогенність клітин підвищується, зокрема, за рахунок утворення великих клітин. Гігантські багатоядерні клітини починають утворюватися вже після впливу рентгенівського опромінення в дозі 1 Гр і їхня кількість швидко зростає разом з підвищенням дози радіації [9]. Площа проекції клітин збільшується в середньому в 2,6 разу, ядра — в 1,7 разу, ядерець — у 2,5 разу (табл. 1) ( $p < 0,05$ ). Ядра великі, змінені пікнотично. З'являється велика кількість клітин з розмірами від 1000 до 2000 мкм<sup>2</sup> (рис. 1, б). Цитоплазма вакуолізована. Мітози відсутні. Відсоток загибелі клітин досить високий.

Вплив гіпертермії 40 °С на культуру мишачих фібробластів супроводжується зростанням проліферативної активності та щільності моношару. Більшість клітин мають веретеновидну форму і щільно розташовані. Розмір клітин та ядер зменшується (рис. 1, в; 2, в). Спостерігається багато двоядерних клітин. З'являються окремі багатоядерні клітини (клітини-гіганти), які виникають внаслідок злиття окремих дочірніх клітин або нерозходження сестринських клітин (незакінчений мітоз), що вказує на порушення репродуктивної здатності. Відмічається зростання кількості і розмірів ядерець. Деструкція ядер підвищена порівняно з контролем. Встановлено утворення великих вакуолей у цитоплазмі.

Після впливу гіпертермії 43 °С на культуру L<sub>929</sub> спостерігається також підвищення щільності моношару і за рахунок цього зменшення розмірів клітин (див. табл. 1) ( $p < 0,05$ ). Утворюються окремі клітини-гіганти. Кількість мітозів велика. З'являється більше округлих ядер. Ядра та ядерця нормохромні, але є деструктивні зміни, які пов'язані з явищами каріорексису, дифузії хроматину в цитоплазму. Деструкція ядра вираженіша, ніж при дії 40 °С. Кількість ядерець зростає до 2—3, площа проекції збільшена (табл. 1) ( $p < 0,05$ ). Контури клітин добре означені. 62 % клітин мають площу в діапазоні від 500 до 750 мкм<sup>2</sup> (рис. 1, г).

При порівнянні морфологічних змін у культурі L<sub>929</sub> після впливу гіпертермії 43 та 40 °С знайдено, що розміри вакуолей у першому випадку набагато менші, тобто спостерігається мікродисперсія вакуолей.

Після комбінованого впливу гіпертермії 40 °С та опромінення у дозі 15 Гр спостерігається зростання клітинного поліморфізму за ознаками роз-

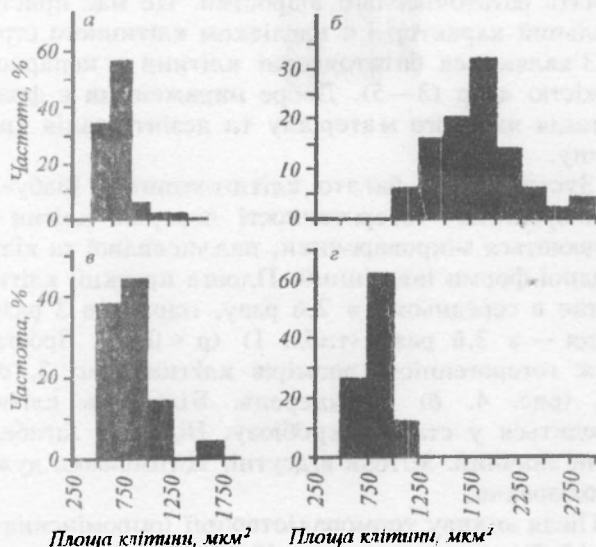


Рис. 1. Гістограма виборок площі проекції клітин культури L<sub>929</sub>. Вплив гіпертермії та іонізуючого опромінення (а — контроль; б — 15 Гр; в — 40 °С; г — 43 °С)

Таблиця 1  
Зміна морфометричних показників клітин культури L929 під впливом гіпертермії та опромінення

Вплив факторів	Площа клітини, мкм <sup>2</sup>	Площа ядра, мкм <sup>2</sup>	Площа ядерця, мкм <sup>2</sup>
Контроль	588,0±125,2	152,4±17,24	9,5±3,9
R = 15 Гр	1578,2±385,9*	269,0±112,5*	23,3±11,3*
40 °С	584,4±195,7	159,5±30,5	12,3±6,4*
43 °С	603,1±131,5	158,0±25,3	12,1±5,4*
40 °С + 15 Гр	1786,0±413,0*	391,0±92,6*	26,0±13,4*
43 °С + 15 Гр	1512,1±412,3*	323,0±86,3*	24,7±11,9*
15 Гр + 43 °С	1612,0±494,6*	345,9±78,7*	21,2±10,0*

\*p < 0,05.

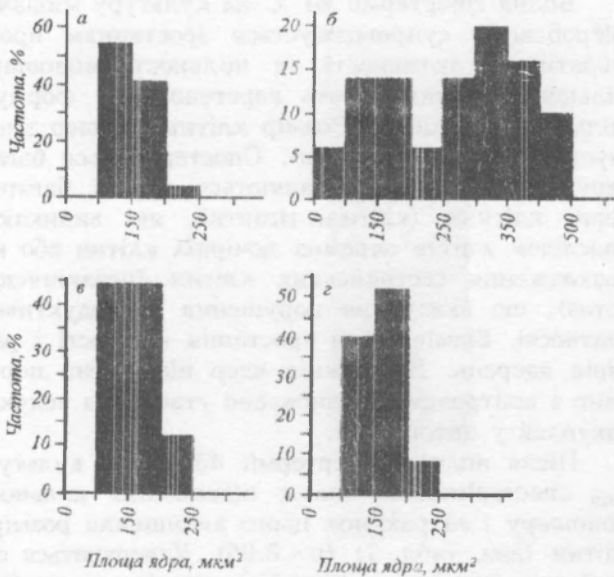


Рис. 2. Гістограма вибірок площі проекції ядер клітин культури L929. Вплив гіпертермії та іонізуючого опромінення (а — контроль; б — 15 Гр; в — 40 °С; г — 43 °С)

міру клітин, ядра, (рис. 3, а; 4, а), ядерць, мембранних структур. Утворюються клітини полігональної форми, які мають багато відростків (4—6), що є характерною ознакою патоморфозу. Зустрічаються округлі клітини, клітини-гіганти; кількість веретеноподібних форм порівняно з контролем зменшується. Величина ядер зростає стрибкоподібно, ядра збільшуються у 2,5 рази.

Зростання розмірів ядра за Ташке [10] вказує на метаболічний зсув у клітині, який виникає внаслідок дії пошкоджуючих факторів. Розмір клітин збільшується в середньому в 3 рази, площа проекції ядерць — у 2,7 рази (табл. 1) (p < 0,05). Останнє вказує на зменшення ступеня диференціювання. Цитоплазма дуже вакуолізована.

Терморадіотерапія (гіпертермія 43 °С та опромінення у дозі 15 Гр) спричинює зростання ступеня деструкції та гетерогенності клітин порівняно з ефектом одного опромінення. Більшість клітин має полігональну форму. Спостерігається істотне підвищення міжклітинної взаємодії, про що свідчать багаточисельні відростки. Це має пристосувальний характер і є наслідком клітинного стресу. З'являються багатоядерні клітини з непарною кількістю ядер (3—5). Добре вираженими є фрагментація ядерного матеріалу та дезінтеграція хроматину.

Зустрічається багато клітин-гігантів. Відбувається зростання гетерогенності поверхні клітин — утворюються мікророслинки, пальцевидної та кільцевидної форми інвагінації. Площа проекції клітин зростає в середньому в 2,6 рази, ядра — в 2 рази, ядерця — в 2,6 рази (табл. 1) (p < 0,05). Зростає також гетерогенність розмірів клітин (рис. 3, б), ядер (рис. 4, б) та ядерць. Більшість клітин знаходиться у стані некробіозу. Відсоток загибелі клітин значний. Мітози відсутні. Цитоплазма дуже вакуолізована.

Після впливу терморадіотерапії (опромінення в дозі 15 Гр та гіпертермія 43 °С) спостерігається значний ступінь деструкції клітин, дезінтеграція хроматину. Більшість клітин має полігональну форму з великими й широкими виростами. Присутні також дуже маленькі клітини з погано розви-



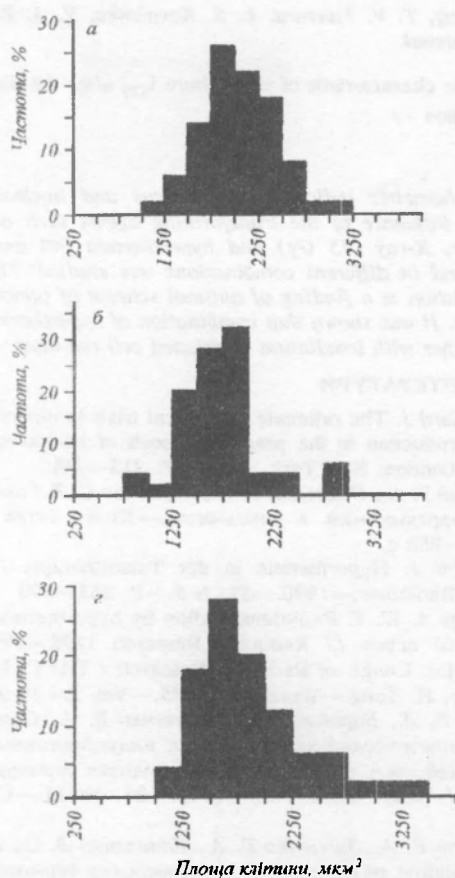


Рис. 3. Гістограма виборок площі проекції клітин культури L<sub>929</sub>. Вплив гіпертермії у комплексі з опроміненням (а — 40 °С + 15 Гр; б — 43 °С + 15 Гр; в — 15 Гр + 43 °С)

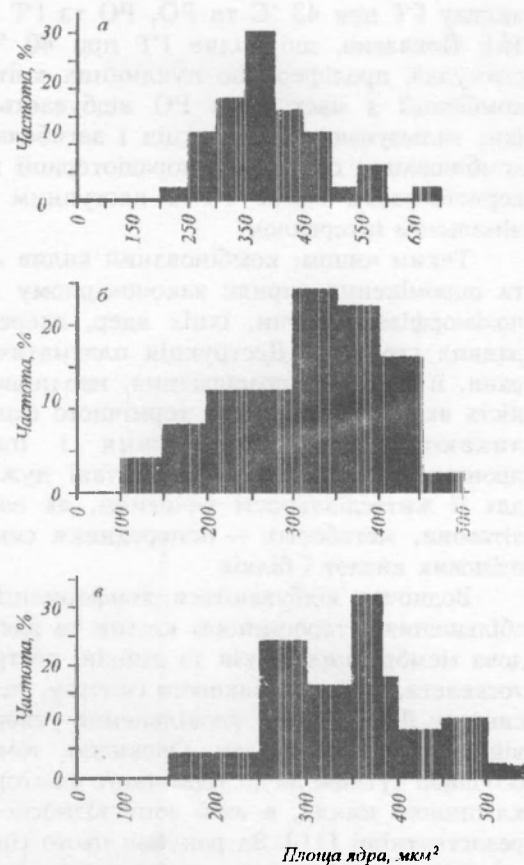


Рис. 4. Гістограма виборок площі проекції ядер клітин культури L<sub>929</sub>. Вплив гіпертермії у комплексі з опроміненням (а — 40 °С + 15 Гр; б — 43 °С + 15 Гр; в — 15 Гр + 43 °С)

Таблиця 2  
Каріометричні показники змін в культурі клітин Нер-2 після ГТ, РО та ТРТ ( $M \pm m$ )

Вплив факторів	Площа клітини, мкм <sup>2</sup>	Площа ядра, мкм <sup>2</sup>
Контроль	507,6 ± 101,6	164,8 ± 26,0
5 Гр	746,0 ± 303,5	163,2 ± 44,4
40 °С	615,3 ± 263,4	168,1 ± 46,3
43 °С	642,2 ± 257,6	160,3 ± 34,7
40 °С + 5 Гр	746,7 ± 257,6	241,3 ± 147,3
43 °С + 5 Гр	490,3 ± 138,4	116,6 ± 29,2
5 Гр + 43 °С	609,7 ± 130,4	151,8 ± 27,7

неною цитоплазмою і гіпохромними ядрами та клітини, які структурно не змінені. Ці дві субпопуляції відповідають за виживання загальної популяції і являють собою джерело рецидивування. Багато клітин-гігантів, багатоядерних. Дуже зростає гетерогенність популяції клітин за ознаками розміру (рис. 3, е). Площа проекції клітин збільшується в середньому в 2,7 разу, ядра — в 2,3 разу, а ядрця — в 2,2 разу (табл. 1) ( $p < 0,05$ ). Цитоплазма вакуолізована, не має чітких кордонів. Більшість клітин знаходиться у стані некробіозу.

Отримані дані ми порівняли з результатами наших попередніх досліджень, які були здійснені на культурі клітин Нер-2 при рентгенівському опроміненні та гіпертермії (табл. 2). Було встановлено, що проліферативна активність пухлинних клітин пригнічується майже в однаковій мірі після

впливу ГТ при 43 °С та РО, РО та ГТ при 43 °С [6]. Показано, що вплив ГТ при 40 °С суттєво стимулює проліферацію пухлинних клітин, але в комбінації з наступним РО відбувається значне їхнє гальмування, деструкція і загибель. Тобто у комбінованих схемах терморадіотерапії краще використувати вплив ГТ з наступним РО з мінімальним інтервалом.

Таким чином, комбінований вплив гіпертермії та опромінення сприяє закономірному зростанню поліморфізму клітин, їхніх ядер, ядерець, мембранних структур. Деструкція плазматичної мембрани, її надмірне розрідження, надлишкова плинність як наслідок впливу термічного фактора викликають різке збільшення і порушення проникності; клітина втрачає такі дуже важливі для її життєдіяльності речовини, як електроліти, вітаміни, метаболіти — попередники синтезу нуклеїнових кислот і білків.

Водночас відбуваються конформаційні зміни, збільшення гетерогенності клітин та ядер, перебудова мембранних білків та ліпідів, деструкція цитоскелета, апарату білкового синтезу, гальмування синтезу ДНК і РНК, уповільнення утворення подвійної спіралі у 3 рази. Очевидно, тому клітини особливо чутливі до дії термічного фактора в S-фазі клітинного циклу, в якій вони відносно найрадіорезистентніші [11]. За рахунок цього гіпертермія і опромінення ефективно доповнюють одне одного, їхнє комбіноване застосування в онкології бачиться особливо перспективним. Такий сумарний стресорний вплив може бути використаний для пошуків та розробки нових методів лікування злоякісних новоутворень.

В. А. Барабой, Т. В. Танцюра, Л. С. Коваленко, В. А. Зинченко, Г. І. Лавренчук

Морфометрическая характеристика клеток L<sub>929</sub> после термического и радиационного воздействия

#### Резюме

В статье по морфометрическим показателям (площадь клетки, ядра, ядрышек) исследовано сравнительное воздействие на культуру L<sub>929</sub> фибробластов, трансформированных метилхолантреном, рентгеновского излучения (15 Гр) и повышенной температуры (40 и 43 °С) порознь и в разной последовательности для нахождения оптимальной схемы терморадіотерапии опухолей. Доказано, что наивысшая степень деструкции клеток наблюдается при последовательности: гипертермия (40 или 43 °С) — лучевое воздействие.

V. A. Baraboy, T. V. Tanzura, L. S. Kovalenko, V. A. Zinchenko, G. I. Lavrentchuk

Morphometric characteristic of cell culture L<sub>929</sub> after the thermic and radiation action

#### Summary

Using morphometric indices (cell, nucleus and nucleoli surface square) the influence of the transforming agents such as methylcholanthrene, X-ray (15 Gy) and hyperthermia (40 and 43 °C) separately and in different combinations was studied. The aim of this investigation is a finding of optimal scheme of tumor thermoradiotherapy. It was shown that combination of hyperthermia (40 or 43 °C) together with irradiation destructed cell the most.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Overgaard J. The rationale for clinical trials in hyperthermia // An Introduction to the practical aspects of clinical hyperthermia.—London; New York, 1990.—P. 213—241.
2. Жаврид Э. А., Осинский С. П., Фрадкин С. Э. Гипертермия и гипергликемия в онкологии.—Киев: Наук. думка 1987.—256 с.
3. Schorcht J. Hyperthermie in der Tumorthherapie // Radiobiol.—Radiother.—1990.—31, N 5.—P. 383—390.
4. Konings A. W. T. Radiosensitization by hyperthermia: Mechanism of action // Radiation Research 1895—1995: Proc Tenth Int. Congr. of Radiation Research / Eds U. Hagen, D. Harder, H. Yang.—Wurzburg, 1995.—Vol. 2.—P. 989—993.
5. Ганул В. Л., Барабой В. А., Зинченко В. А., Сегеда Т. П. ЦитокINETическая характеристика индуцированных ДМБА опухолей крыс при различных вариантах терморадіотерапии // Вопр. онкологии.—1992.—38, № 11.—С. 1376—1379.
6. Барабой В. А., Зинченко В. А., Коваленко Л. С., Сегеда Т. П. Влияние различных схем проведения терморадіотерапии на кинетические показатели клеток рабдомиосаркомы, саркомы 45 у крыс и клеток культуры Нер-2 // Эксперим. онкология.—1993.—15, № 4.—С. 70—74.
7. Барабой В. А., Бобро Л. И., Зинченко В. А. Патоморфоз и пролиферативная активность рабдомиосарком крыс при термо- и лучевом воздействии // Клин. онкология.—1992.—№ 12.—С. 62—67.
8. Календо Г. С. Ранние реакции клеток на ионизирующее излучение и их роль в защите и сенсibiliзации.—М. Энергоиздат, 1982.—96 с.
9. Лавренчук Г. И. Исследование жизнеспособности трансформированных фибробластов и дифференцировки миогенных клеток, облученных плотно- и редкоионизирующей радиацией: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Киев, 1988.—20 с.
10. Ташке К. Введение в количественную цитогистологическую морфологию.—Бухарест: Академия Соц. Респ. Румынии, 1980.—191 с.
11. Field S. B. In vivo aspects of hyperthermic oncology // An introduction to the practical aspects of clin. hyperthermia / Eds S. B. Field, Y. W. Hand.—London; New York: Philad, Taylor and Francis, 1990.—P. 55—68.

УДК 616-006-018.1:615.849/092.9

Надійшла до редакції 16.02.98