

РЕДОКС-ЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

© 2012 Т.П. Генинг, О.С. Воронова, Д.Р. Долгова, Т.В. Абакумова, Г.С. Аляпышев

Ульяновский государственный университет

Поступила в редакцию 20.11.2012

Изучены показатели перекисного окисления липидов и ферментативного звена антиоксидантной системы, а также морфометрические показатели опухолевой ткани после воздействия различных доз фемтосекундного лазерного излучения на различных стадиях экспериментального рака шейки матки. Установлено, что данное излучение дозозависимо увеличивает в опухолевой ткани объем участков некроза и на 30-ые сутки после трансплантации стимулирует в неоплазме возникновение оксидативного стресса.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, антиоксиданты, рак шейки матки, фемтосекундное лазерное излучение.

Согласно современным представлениям, канцерогенез является многоступенчатым процессом, включающим, по крайней мере, три стадии: инициации, промоции и прогрессии. Оксидативный стресс играет ведущую роль в механизмах развития всех трех этапов. При этом на стадии инициации в результате оксидативного стресса могут возникать повреждения ДНК как в результате мутаций гена, так и в результате структурных её повреждений, помимо механизмов, вызывающих нестабильность генома. Оксидативный стресс может активировать определенные сигнальные пути и тем самым способствовать развитию опухоли и метастазированию на последующих этапах канцерогенеза [1, 2].

Использование лазеров в онкологии было предложено более 40 лет назад. На сегодня показано иммуномодулирующее и регенерирующее влияние низкоинтенсивного лазерного излучения (ЛИ). Высокоинтенсивное лазерное излучение предполагается использовать в качестве лазерного ножа. Широкому использованию лазеров в онкологической клинике препятствует отсутствие единой точки зрения на возможность стимуляции пролиферации опухолевого узла и процессов метастазирования, а также отсут-

ствие данных об изменении биологического портрета опухолей различной тканевой организации при воздействии ЛИ с различными параметрами. Основными преимуществами фемтосекундных (ФС) лазеров является малая длительность импульса, высокая пиковая (кВт) и малая средняя (мВт) мощности, что позволяет предполагать отсутствие выраженных термических эффектов. В медицине сегодня эти лазеры используются в качестве голографического пинцета и оптического скальпеля. Использование фемтосекундного лазерного излучения (ФСЛИ) в терапии поверхностно локализованных опухолей позволило бы существенно снизить лучевую нагрузку на пациента.

В соответствии вышесказанным, целью исследования было изучение влияния ФСЛИ на показатели оксидативного стресса в опухолевой ткани при экспериментальном раке шейки матки (РШМ).

Материалы и методы исследования. Модель РШМ была воспроизведена на белых инбредных мышцах массой не менее 20 г путем перевивки опухолевого штамма РШМ-5 (НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва).

Использовали фемтосекундный волоконный эрбиевый лазер, который является совместной разработкой Научного центра волоконной оптики Российской Академии наук и Ульяновского государственного университета, со следующими характеристиками: длительность импульса $100 \cdot 10^{-15}$ с, пиковая мощность 6 кВт, средняя мощность $1,26 \text{ мВт} \pm 2\%$, $\lambda = 1,55 \text{ мкм}$. При облучении ФС лазером средняя плотность энергии на ткань (энергетическая доза) за одну процедуру составляла $0,24 \text{ Дж/см}^2$ за 10 минут и $0,36 \text{ Дж/см}^2$ за 15 минут, но при этом облучение проходило в импульсном ре-

Генинг Татьяна Петровна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии. E-mail: Naum-53@yandex.ru

Воронова Ольга Сергеевна младший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии. E-mail: baby13.87@mail.ru

Долгова Динара Ришатовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной и клеточной биологии. E-mail: tonika_rainbow@mail.ru

Абакумова Татьяна Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и патофизиологии. E-mail: taty-abakimova@yandex.ru

Аляпышев Григорий Сергеевич, студент.

жиме при огромной пиковой интенсивности, равной 1910,8 Вт/см². При 10-ти процедурах 10-ти минутного лазерного облучения суммарная энергетическая доза ЛИ за курс составила 2,4 Дж/см². При 10-кратном облучении в режиме 15-ти минут на расстоянии 10 см суммарная плотность энергии на ткань составила 3,6 Дж/см².

Биохимические методы исследования.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по уровню вторичного продукта – малонового диальдегида (МДА) в тесте с тиобарбитуровой кислотой [3]. Активность супероксид-дисмутазы (СОД) определяли по методу Nishikimi M. в модификации Дубининой Е.Е. [4, 5], каталазы и глутатион-редуктазы (ГР) по Карпищенко А.И. [6], глутатион-S-трансферазы (ГТ) по Nabig W.H.[7]. Активность антиоксидантных ферментов и уровень МДА пересчитывались на 1 мг белка, который определяли по методу Брэдфорда [8].

Морфологические методы исследования.

Опухолевый материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезживали в спиртах, заключали в парафин. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином. Для морфометрического исследования применялась компьютерная видео-тест-система с программой денситофотометрии «Mecos C1». При анализе гистологических срезов производился расчет удельного объема опухолевой паренхимы, удельного объема опухолевой стромы, удельного объема участков некроза, митотического и апоптотического индексов. Апоптотические клетки определяли по уровню маргинации хроматина, неровным контурам ядра, наличию кариопикноза и кариорексиса, а также по некоторым изменениям в цитоплазме (изменение окрашивания цитоплазмы, вакуолизация цитоплазмы, изменение контуров и фрагментация клеток) [9].

Статистическая значимость полученных результатов оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и корреляционного критерия значимости (Т) по Стьюденту. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Опухолевая трансформация сопровождается изменением внутриклеточного метаболизма, в частности, изменением образования и утилизации различных форм активного кислорода.

Наши исследования показали достоверное увеличение показателей уровня МДА с ростом опухоли (27,94±1,60; 36,3±1,22; 58,55±6,51 мкмоль/мг белка на 20-ые, 30-ые, 40-ые сутки после трансплантации, соответственно) (рис. 1), что не противоречит данным литературы об усилении ПОЛ при прогрессировании неоплазмы, хотя существует мнение, согласно которому активность процессов ПОЛ в опухолевых клетках может быть снижена [10].

Активность антиоксидантных ферментов (АОФ) в неоплазме в процессе развития РШМ-5 (табл. 1) зависела от стадии развития опухоли.

Как следует из представленных данных, при прогрессировании РШМ-5 в неоплазме достоверно возрастает активность СОД и ГТ (табл. 1). Уровень каталазы, напротив, снижается с увеличением сроков роста опухоли, количество ГР значимо не изменяется. Таким образом, в динамике прогрессирования РШМ-5 имеет место возрастание уровня МДА в неоплазме при разнонаправленном изменении активности ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ), что позволяет предполагать возникновение в опухолевой ткани оксидативного стресса.

Установлено, что молекулы кислорода, находящегося в межлипидном пространстве мембран клеток, являются основным акцептором ЛИ. Возникающие при этом гидроперекиси липидов в при-

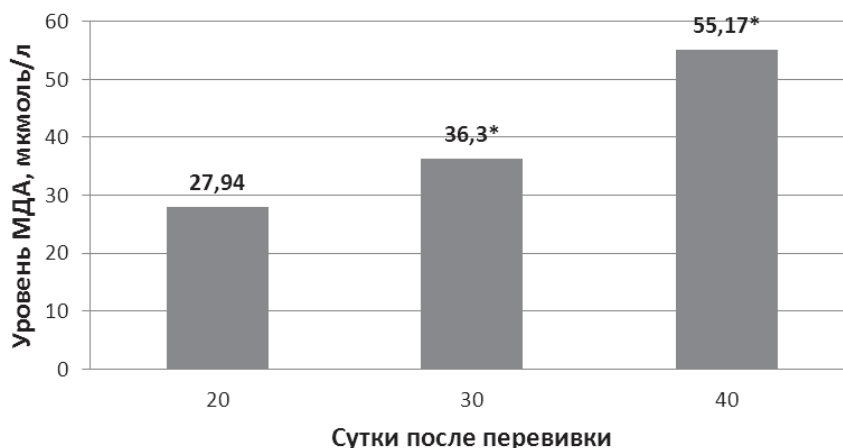


Рис. 1. Уровень МДА в неоплазме мышей на разных сроках после трансплантации РШМ-5

Примечание: * - данные, статистически значимо отличающиеся от данных контроля, $p \leq 0,05$

Таблица 1. Показатели ферментов АОЗ в неоплазме мышей в динамике прогрессирования РШМ-5

Антиоксидант, ед. изм. Сроки после перевивки опухоли	СОД, у.е./мг белка (n=18)	Каталаза, ммоль/с/мг белка (n=18)	ГР, ммоль/мин/мг белка (n=18)	ГТ, ммоль/мин/мг белка (n=18)
20 сутки	9,23±0,93	0,747±0,345	0,235±0,008	0,465±0,076
30 сутки	26,57±6,00*	0,537±0,100*	0,212±0,016	1,502±0,292*
40 сутки	27,10±4,70*	0,592±0,160*	0,218±0,018	1,603±0,152*

Примечание: * – данные, достоверно отличающиеся от данных на 20-ые сутки после трансплантации опухоли, $p \leq 0,05$

сутствии восстановленных форм железа инициируют цепную реакцию окисления полиненасыщенных жирных кислот клеточных мембран и плазмы крови. Синглетный кислород, образующийся в результате фотохимических реакций, в частности, может повреждать цитоплазматические мембраны, что сопровождается соответствующими физиологическими реакциями на уровне целостного организма. Корси Л.В. с соавт. (2009) показали, что облучение клеток опухоли на длине волны 1268 нм приводит к образованию синглетного кислорода и индуцируемых им реакций окисления, так как ближний инфракрасный диапазон является спектром поглощения кислорода [11].

Изменение уровня МДА в неоплазме под влиянием ФСЛИ представлено в табл. 2

Воздействие ФСЛИ в дозах 2,4 Дж/см² и 3,6 Дж/см² статистически значимо увеличивает количество МДА в неоплазме на 20-ые и снижает на 30-ые сутки после трансплантации опухоли.

Результаты изучения активности ферментов АОЗ в неоплазме после ФСЛИ представлены в табл. 3.

ФСЛИ на 20-ые сутки после трансплантации РШМ-5 не влияет на активность ГР и каталазы, одновременно увеличивая активность СОД. Уровень ГТ изменяется волнообразно в зависимости от дозы облучения (табл. 3). На 30-ые сутки после перевивки опухоли активность ГР и СОД снижается при возрастании активности каталазы (табл. 3).

Морфологическая характеристика опухолевой ткани при прогрессировании РШМ-5

При оценке морфометрических показателей опухолевой ткани в динамике прогрессирования РШМ-5 установлено, что имеет место достоверное снижение удельного объема опухолевой паренхимы с $76,81 \pm 2,01\%$ на 20-ые сутки, до $65,34 \pm 2,78\%$ на 30-ые и $43,09 \pm 7,58\%$ на 40-ые сутки после трансплантации опухоли. Одновременно снижается и удельный объем опухолевой стромы с $1,207 \pm 0,158\%$ на 20-ые сутки после перевивки до $0,200 \pm 0,036\%$ на 30-ые и $0,070 \pm 0,025\%$ на 40-ые сутки. Уменьшение площади паренхимы, вероятно, обусловлено увеличением зон некроза ($21,99 \pm 2,05\%$; $34,64 \pm 2,76\%$; $53,35 \pm 11,06\%$ на 20-ые, 30-ые и 40-ые сутки, соответственно). С ростом опухоли возрастает число и размеры участков некроза, выявляемых как в центральных, так и в периферических отделах опухолевой ткани. Апоптотический и митотический индексы достоверно не изменяются в динамике прогрессирования опухоли. При этом апоптотический индекс составляет на 30-ые сутки $67,00 \pm 4,25\%$, на 40-ые сутки $82,25 \pm 9,74\%$ относительно 20-х суток ($87,00 \pm 3,76\%$). Митотический индекс значимо не изменяется на всех сутках после трансплантации опухоли ($87,00 \pm 3,76$; $67,00 \pm 4,25$; $82,25 \pm 9,74\%$ на 20-ые, 30-ые, 40-ые сутки после трансплантации опухоли, соответственно).

Таблица 2. Уровень МДА (ммоль/мг белка) в неоплазме РШМ-5 при воздействии разных доз ФСЛИ

Доза ФСЛИ Эксперимент. группа	Без облучения n=18	$\bar{E}_{\text{сред.}}=2,4 \text{ Дж/см}^2$ n=18	$\bar{E}_{\text{сред.}}=3,6 \text{ Дж/см}^2$ n=18
20 сутки РШМ -5	27,94±1,600	32,17±1,150*	33,92±2,780*
30 сутки РШМ -5	36,30±1,220	32,44±0,960*	33,81±1,490

Примечание: * - данные статистически значимо отличающиеся от данных без облучения, $p < 0,05$

Таблица 3. Активность ферментов АОЗ в опухолевой ткани РШМ-5 в разные сроки после трансплантации опухоли при воздействии ФСЛИ

Группы Показатели	20-е сутки роста РШМ			30-е сутки роста РШМ		
	Без облучения n= 20	$\bar{X}_{\text{сред.}}=2,4$ Дж/см ² n= 12	$\bar{X}_{\text{сред.}}=3,6$ Дж/см ² n= 12	Без облучения n= 20	$\bar{X}_{\text{сред.}}=2,4$ Дж/см ² n= 12	$\bar{X}_{\text{сред.}}=3,6$ Дж/см ² n= 12
ГР, ммоль/ми н/мг	0,24±0,008	0,240±0,009	0,250±0,006	0,210±0,016	0,170±0,004*	0,140±0,005*
ГТ, ммоль/ми н/мг	0,470±0,076	0,750±0,070*	0,560±0,077	1,50±0,292	1,74±0,120	0,64±0,065*
СОД, у.е./мг	9,23±0,93	12,92±1,92*	17,10±1,40*	26,57±2,00	8,15±0,20*	14,86±3,41*
Каталаза, ммоль/с/мг	0,750±0,345	0,530±0,110	1,050±0,169	0,540±0,100	0,450±0,073	0,810±0,019*

Примечание: * - данные статистически значимо отличающиеся от данных без облучения, p<0,05

Воздействие ФСЛИ в обеих использованных дозах на разные сутки после трансплантации опухоли вызывает достоверные изменения в морфометрических показателях опухолевой ткани (табл. 4).

На 20-е сутки после трансплантации опухоли ФСЛИ приводит к уменьшению удельного объема опухолевой паренхимы (рис.2), стромы, митотического и апоптотического индексов (%). Однако, при облучении мышей ФС лазером вдвое возрастает удельный объем участков некроза, что позволяет предполагать о том, что ФСЛИ является активатором некротических процессов в опухолевой ткани экспериментального РШМ (рис.3-4). На 30-е сутки после трансплантации опухоли воздействие ФС лазером вызывает те же изменения, что и на 20-е сутки после перевивки, за исключением изменений в удельном объеме опухолевой стромы: на 30-е сутки облучение ФС-лазером дозозависимо увеличивает объем опухолевой стромы (рис.2).

Результаты данного исследования позволяют предполагать, что ФСЛИ в исследуемых дозах стимулирует некроз опухолей.

ВЫВОДЫ

1. ФСЛИ в неоплазме на 20-е сутки после трансплантации РШМ-5 повышает уровень функциональной активности системы «перекисное окисление липидов - антиоксиданты». На 30-е сутки после трансплантации РШМ-5 опухоли ФСЛИ стимулирует в неоплазме оксидативный стресс.

2. Под влиянием ФСЛИ в опухолевой ткани РШМ-5 возрастает объем участков некроза при одновременном снижении удельного объема паренхимы, митотического и апоптотического индексов.

Работа выполнена при поддержке грантов государственной Минобрнауки РФ и гранта Президента РФ.

Таблица 4. Морфологические показатели опухолевой ткани при РШМ-5 мышей

Группа Показатели	20-е сутки роста РШМ			30-е сутки роста РШМ		
	Без облучения	$\bar{X}_{\text{сред.}}=2,4$ Дж/см ²	$\bar{X}_{\text{сред.}}=3,6$ Дж/см ²	Без облучения	$\bar{X}_{\text{сред.}}=2,4$ Дж/см ²	$\bar{X}_{\text{сред.}}=3,6$ Дж/см ²
Удельный объем опухолевой паренхимы (%)	76,81±2,01	57,39±0,41*	53,59±3,73*	65,34±2,78	41,22±3,22*	56,02±5,34*
Удельный объем опухолевой стромы (%)	1,21±0,16	0,49±0,04*	0,25±0,01*	0,2±0,036	0,38±0,01*	0,50±0,21*
Удельный объем участков некроза (%)	21,99±2,05	42,12±0,37*	46,17±3,73*	34,64±2,76	58,41±3,22*	43,50±5,14*
Митотический индекс, (%)	18,00±1,40	15,63±5,63	9,38±3,13*	18,00±3,18	6,25±2,50*	5,00±0,01*
Апоптотический индекс, (%)	87,00±3,76	33,75±6,25*	23,13±1,88*	67,00±4,25	26,25±10,00*	23,13±1,88*

Примечание: * - данные, значимо отличающиеся от показателей без облучения

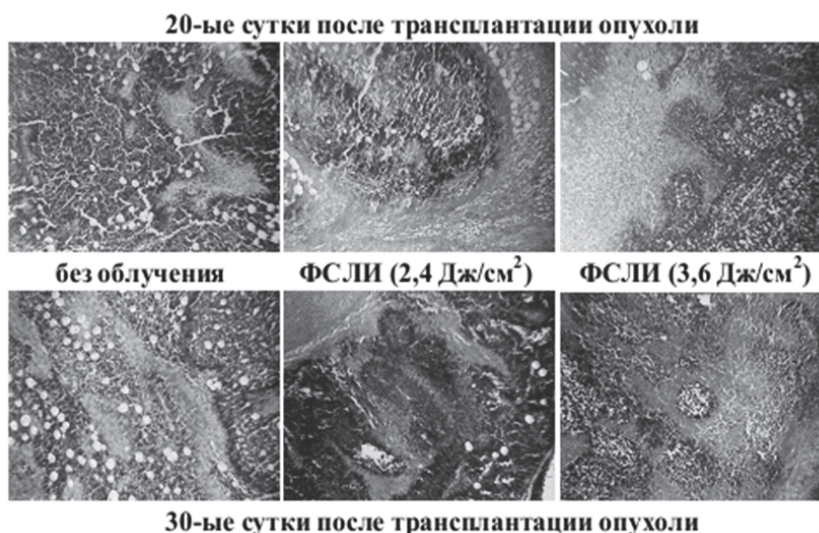


Рис. 2. Опухоль РШМ-5 до и после воздействия ФСЛИ на разные сутки после трансплантации опухоли. Окраска гематоксилин-эозином. Микрофото x100

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kamata T.* Roles of Nox1 and other Nox-isoforms in cancer development // *Cancer Sci.* 2009. Vol.100(8). P.1382-1388.
2. Закономерности паранеопластических расстройств при отечно-инфильтративной форме рака молочной железы / В.Ю.Барсуков, В.Н.Плохов, Н.П.Чеснокова // *Современные проблемы науки и образования.* 2008. №1. С. 13-19.
3. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И.Андреева, А.А.Кишкун, Л.А.Кожмякин // *Лаб.дело.* 1988. №11. С.41-43.
4. Дубинина Е.Е. Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма // *Успехи соврем.биол.* 1989. Т.108. №1(4). С.3-18.
5. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenacine methosulfate and molecular oxygen / *M.Nishikimi, N.Appa, K.Yagi* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. Vol.46. P.849-854.
6. *Карпищенко А.И.* Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник: в 2 т. СПб.: Интермедика 1999. 656 с.
7. Glutathione S-transferase novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration / *W.H.Habig, M.J.Pabst, W.B.Jakoby* // *J.Biol.Chem.* 1974. Vol.249 (22). P.7140-7147.
8. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol.72. P.248-54.
9. Манских В.Н. Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза // *Бюллетень сибирской медицины.* 2004. №1. С.63-70.
10. Оху-радикальные источники, scavenger системы и мембранная повреждение в раковых клетках / *T.Galeotti, S.Borello, L.Masotti* // In: *Oxygen Radicals: Systemic Events and Disease Processes.* Basel: Karger, 2004. P.129-148.
11. *Корси Л.В., Соколов В.Г.* Лазерный способ фотохимической деструкции опухолей без экзогенных сенсibilizаторов // *Сборник «Лазерно-оптические системы и технологии».* М.: ФГУП «НПО Астрофизика», 2009. С.101-106.

REDOX-DEPENDENT PROCESSES IN THE TUMOR TISSUE OF CERVICAL CANCER AFTER EXPOSURE TO FEMTOSECOND LASER

© 2012 T.P. Gening, O.S. Voronova, D.R. Dolgova, T.V. Abakumova, G.S. Alyapyshev

Ulyanovsk State University

The lipid peroxidation and antioxidant enzyme level, and morphometric characteristics of the tumor tissue after exposure to different doses of femtosecond laser radiation at different stages of experimental cervical cancer. We found that the radiation dose-dependent increases in tumor volume and areas of necrosis on the 30th day after transplantation stimulates neoplasm occurrence of oxidative stress.
Key words: lipid peroxidation, antioxidants, cervical cancer, femtosecond laser irradiation

Tatyana Gening, Doctor of Biology, Professor, Head at the Physiology and Pathophysiology Department.
E-mail: Naum-53@yandex.ru
Olga Voronova, Associate Research Fellow at the Laboratory of Molecular and Cellular Biology. E-mail: baby13.87@mail.ru
Dinara Dolgova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow

at the Laboratory of Molecular and Cellular Biology.
E-mail: monika_rainbow@mail.ru
Tatyana Abakumov, Candidate of Biology, Associate Professor at the Physiology and Pathophysiology Department.
E-mail: taty-abakumova@yandex.ru
Gregory Alyapyshev, Student.