

ДИНАМИКА И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АПОПТОЗА И НЕКРОЗА КЛЕТОК В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У СОБАК В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ТЕРАПИИ*

Аннотация: Неоадьювантная терапия при опухоли молочной железы у собак сопровождается закономерной динамикой соотношения апоптоза и некроза. Эти критерии можно рассматривать в качестве патогенетического маркера эффективности лечения и прогноза опухолевого процесса. Необходимым условием для этого является определение уровня спонтанного апоптоза и некроза.

Ключевые слова: апоптоз, некроз, опухоль, молочная железа, неоадьювантная терапия.

В последнее десятилетие существенное внимание специалистов медико-биологической направленности привлекает проблема апоптоза – клеточной гибели, обусловленной генетической программой, направленной на самоликвидацию. Апоптозу подвержены все виды тканей, при этом опухолевая ткань, несмотря на свою эксклюзивность и антибиологичность по отношению к живому организму, не является исключением [5; 7; 12].

Появилось много сообщений об апоптозе, как о важнейшем элементе патогенеза опухолевой болезни. Считается, что число апоптозных клеток может свидетельствовать о динамике опухолевого процесса [5; 8]. Показано также, что, наряду со стадией заболевания, апоптозный индекс является важным критерием выживаемости больных раком [9]. При этом, рассматривая спонтанный апоптоз, большинство авторов сходятся во мнении, что он не является независимым прогностическим признаком, а определяется величиной митотического индекса. Так, установлено, что в менее дифференцированных опухолях апоптозный индекс значительно выше, чем в высококодифференцированных. В тоже время имеются сообщения о благоприятном течении и возможности самопроизвольной регрессии фибросаркомы у новорожденного с высоким уровнем апоптоза на фоне низкой пролиферативной активности опухолевых клеток [5]. Уже не вызывает сомнения, что спонтанный апоптоз можно рассматривать как важнейший фактор регуляции канцерогенеза. Однако его прогностическая ценность в различных опухолях и на разных стадиях их развития спорна.

Особое внимание следует уделить понятию «индуцированный апоптоз», который, по нашему мнению, можно рассматривать как прогрессивный элемент в патогенезе опухолевой болезни. В связи с этим представляет интерес изучение динамики апоптоза в опухоли под влиянием лечебных манипуляций и химиотерапевтических препаратов. Выполнены исследования, свидетельствующие об апоптозиндуцирующем действии лучевой и антибиотикотерапии при раке [4; 10; 11 и другие]. Имеются результаты исследований, подтверждающие, что после облучения значительное число опухолевых клеток погибает путем апоптоза [5]. При этом считается, что величина апоптозного индекса до облучения опухоли может служить независимым фактором в оценке прогноза у больных, получивших лучевую терапию.

Не исключено, что в том случае, когда индуцирующий фактор направлен на подавление пролиферативной активности опухолевых клеток, происходит разрыв цепи взаимосвязанных механизмов, обуславливающих высокую степень коррелятивной за-

* © Тимченко Л.Д., Саркисян И.Х., Арешидзе Д.А.

всисмости между спонтанным апоптозом и митозом. Можно предположить, что такое лечебное воздействие одновременно подавляет митотическую активность и повышает уровень апоптоза клеточных элементов опухоли, что неизбежно должно приводить к ее регрессии как системы.

Сведения, приведенные в доступной литературе, позволяют считать, что гибель клеток опухоли, наряду с апоптозом, происходит также и путем некроза. Однако некроз, в отличие от апоптоза, – процесс, сопряженный с такими сопутствующими повреждениями ткани, как воспаление, комплекс иммунных, в том числе аутоиммунных процессов, зачастую осложняющими течение заболевания в целом. Поэтому можно полагать, что апоптоз, по сравнению с некрозом, обеспечивает минимальное повреждение тканей [3].

В связи с этим основным направлением тактики противоопухолевой терапии является изыскание методов стимуляции интенсивности гибели опухолевых клеток преимущественно путем индукции апоптоза, по сравнению с некрозом. Критерии соотношения апоптоза и некроза в опухоли могут служить маркерами интенсивности разрабатываемой терапии.

В настоящее время в онкологии существуют многочисленные методы и комбинации, направленные на устранение опухоли. Однако в ветеринарии их арсенал и сегодня невелик. Общеизвестно, что у животных наиболее радикальным является хирургическое удаление опухолевых узлов. Но и это не устраняет полностью вероятности возникновения метастазов и рецидива болезни.

Поэтому не теряет актуальности изыскание новых комплексных подходов подавления опухолевого роста, требующих для животных всестороннего патоморфологического обоснования и клинического подтверждения. В этом смысле заслуживает внимания терапия, включающая в себя перечень неоадьювантных и консервативных постоперационных манипуляций, направленных как на регрессию основного опухолевого узла, так и на предотвращение рецидива.

Наибольший интерес, по нашему мнению, представляет неоадьювантная терапия, представляющая из себя комплекс различных предоперационных мероприятий, направленных на подавление опухолевого роста уже в процессе подготовки больного к оперативному вмешательству, а в отдельных случаях позволяющая отдалить на длительное время или совсем устранить необходимость в радикальных мерах. В качестве элементов неоадьювантной терапии у человека с успехом апробированы самостоятельно и в комплексе друг с другом химиотерапия, аутогемохимиотерапия, иммуномодуляция и многочисленные методы физиологической стимуляции организма, направленные на коррекцию нарушенного гомеостаза [2].

Кстати, не исключено, что существенные различия уровня гомеостаза, в том числе иммунного, наряду с другими факторами могут быть причиной разногласий по поводу прогностического значения апоптоза в спонтанном и индуцированном морфогенезе опухоли. В связи с этим представляется перспективным изучение закономерностей этой взаимосвязи, как и самих критериев апоптоза, для различных видов опухолей у млекопитающих. Это вполне могло бы послужить научной основой для разработки рациональной лечебной тактики, сочетающей специфические противоопухолевые средства и иммунотропное воздействие.

Для животных, в том числе для собак, методы, применяемые в классической онкологии, пока еще не адаптированы, так как не отработаны дозы, кратность и способ введения противоопухолевых средств, нет четких рекомендаций по спектру иммунотропных препаратов, эффективных при раке и схемам их применения, отсутствует патоморфологическое обоснование лекарственного патоморфоза опухолей и эффективности различных вариантов неоадьювантной терапии.

В качестве контроля эффективности неoadьювантной терапии в динамике представляет интерес изучение соотношения уровня апоптоза и некроза в опухоли, что и обусловило направление проведенных нами исследований.

Работа проведена в течение 2001-2007 гг. на 60 спонтанно отобранных собаках со злокачественными новообразованиями молочной железы (аденокарцинома различной степени дифференцировки). Поэтапно были сформированы три группы животных, по 20 собак в каждой. Все животные до начала лечения находились под наблюдением не менее двух недель. У всех собак до лечения и по его завершению отбирали биопсийный материал опухоли для исследования с целью дифференциации и подсчета апоптических и некротических клеток, с последующим вычислением индексов этих показателей. Количество апоптических и некротических клеток определяли по методу, предложенному А.А. Абдувалиевым и М.С. Гильдиевой, с помощью окраски трипановым синим [1]. Проводили также гистологические исследования с целью установления морфологического типа опухоли и степени ее дифференцировки.

Первая группа: животным после установления диагноза вводили внутримышечно цитостатик – циклофосфан в дозе 6 мг/кг через день, курсовая доза – 6 г.

Вторая группа: осуществляли аутогеохимиотерапию (АГХТ) по методу Ю.С. Сидоренко в собственной модификации [6]. Метод заключается во введении (в/в, капельно) циклофосфана, в дозе 10 мг/кг смешанного с кровью (10-50 мл, в зависимости от живой массы собаки), полученной из периферической вены, и с глюцициром (20-50 мл), после 30-минутной экспозиции в термостате. Манипуляции проводили один раз в пять дней, трехкратно.

Третья группа: осуществляли АГХТ по вышеизложенной методике. Через день после каждого введения аутокрови с цитостатиками (три раза) подкожно вводили новый иммуностимулирующий препарат «СТЭМБ» (патент РФ № 2197251), обладающий, наряду с целым комплексом свойств, направленных на стимуляцию многих физиологических параметров организма, также и выраженным эффектом активизации макрофагальной реакции, что, по нашему мнению, способствует уничтожению циркулирующих клеточных субстанций опухоли – метастазов. Потенциальную эффективность использования препарата «СТЭМБ» обуславливает наличие в нем альфа-фетопротеина, широко рекомендуемого в последнее время в качестве противоопухолевого средства. Препарат «СТЭМБ» вводили из расчета 0,1 мл на 1 кг живой массы.

Подсчет апоптических и некротических клеток осуществляли через месяц после начала лечения. Результаты исследования представлены в таблице.

Кроме того, у животных всех трех групп до лечения исследовали апоптический и некротический индексы в биопсийном материале ткани здоровой молочной железы, которые составили в среднем $0,14\% \pm 0,07$ и $0,11\% \pm 0,05$.

Динамика апоптозного и некротического индексов в опухолях молочной железы у собак в процессе лечения

Группы животных	Апоптозный индекс, %		Некротический индекс, %	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
1	$0,61 \pm 0,04$	$1,22 \pm 0,19$	$0,24 \pm 0,11$	$1,11 \pm 0,09$
2	$0,75 \pm 0,09$	$2,45 \pm 0,34$	$0,33 \pm 0,15$	$0,77 \pm 0,21$
3	$0,84 \pm 0,10$	$4,78 \pm 0,21$	$0,45 \pm 0,07$	$1,04 \pm 0,13$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что во всех трех группах апоптозный индекс до проведения неoadьювантной терапии превышает некротический индекс в

2,5; 2,3 и 1,9 раза, соответственно. При этом, чем больше апоптический индекс, тем выше и некротический. Параллельно проведенные гистологические исследования подтвердили в разной степени выраженную степень дифференцировки опухолевых клеток. Однако в большинстве опухолей клетки не однотипны по размеру и структуре ядра, встречается много крупных клеток с достаточно высокой интенсивностью митоза, с десиминированным ядерным веществом, что является, вероятно, следствием безудержных митозов, встречаются самостоятельно расположенные в поле зрения клетки с выраженной конденсацией хроматина. Некротические клетки единичные. Клетки в опухоли расположены бессистемно. Митотическая активность до лечения в целом высокая и подтверждается наличием многоядерных клеток, множественными фигурами деления. В большинстве опухолей хорошо развита сосудистая сеть, представленная крупными сосудами. В отдельных из них стенка инфильтрирована опухолевыми клетками, иногда в просвете сосуда – опухолевые эмболы. Соотношение паренхимы и стромы опухолевой ткани превалирует в сторону паренхимы. Строма опухоли до начала лечения представлена небольшим количеством тонких волокнистых структур, клеток соединительной ткани и хорошо развитой капиллярной системой.

Таким образом, клиническая и гистологическая картина у собак до лечения свидетельствует о прогрессивном патоморфозе опухолевого процесса молочной железы, сопровождающемся определенной динамикой соотношения уровня спонтанного апоптоза и некроза. Признаков воспаления в опухолевой ткани не установлено.

Учитывая полное отсутствие подобных сведений для животных, а также тот факт, что спонтанный апоптоз и некроз в опухоли существенно превышают аналогичные показатели в непораженной ткани молочной железы собак, полученные данные представляют определенный теоретический и практический интерес, в частности, прогностический. Однако, по нашему мнению, проведенных исследований еще недостаточно для того, чтобы установленные величины апоптического индекса можно было использовать в качестве достоверного и независимого критерия характеристики той или иной формы злокачественной опухоли собак.

Динамика индуцированного апоптоза после лечения свидетельствует о его закономерном усилении у животных всех опытных групп. Однако в третьей группе, где использовали АГХТ с циклофосфаном в сочетании с иммунокорректором, апоптозный индекс по сравнению со спонтанным, увеличился больше всего: в 5,7 раза, в то время как во второй он повысился в 3,3 раза, а в первой – в 2 раза.

Некротический индекс также возрос. Однако при этом в первой группе его увеличение выражено наиболее интенсивно: в 4,6 раза. При этом уровень некроза практически приблизился к уровню апоптоза в этой группе. В третьей и второй группах индекс некроза возрос одинаково: в 2,3 раза по сравнению с его показателями до лечения.

Сопоставляя полученные результаты с гистологической картиной, следует отметить, что в третьей группе уже через месяц после лечения наиболее выражена динамика регресса опухоли.

Интенсивность митоза снижена, клетки опухоли более однотипны. Появляются скопления клеток с выраженной конденсацией ядерного хроматина или видимой фрагментацией клетки, что расценивали как гистологические признаки индукции апоптоза. Часть опухолевых клеток подверглась некрозу и лизису. Некрозы милиарные, преимущественно моноклеточные, неравно диссеминированные по площади среза. В отдельных полях зрения встречаются достаточно часто. Признаки воспаления не выражены.

Аналогичная картина наблюдается и во второй группе. Однако скопления апоптических клеток и апоптозных телец встречаются реже, а тенденция к мономорфизму опухолевых клеток и ядер менее четко выражена, чем в третьей группе.

В обеих группах отмечается снижение интенсивности кровоснабжения опухоли. Особенно заметно снижается количество капилляров в строме. Изменяется соотношение паренхимы и стромы в сторону стромальных элементов. В строме, особенно в третьей группе, существенно увеличивается количество волокнистых структур, гистиоцитов, макрофагов и лимфоцитов.

Как в третьей, так и во второй группах признаки регрессии выражены и при внешнем осмотре. Пальпаторно - опухолевые узлы более плотные, сконцентрированы, границы четче выражены по сравнению с опухолями до лечения. Случаев гибели животных до конца лечения не было.

У собак первой группы, где применяли только цитостатик, митотическая активность снизилась примерно так же, как и в других группах. Однако степень дифференцировки клеточных элементов опухоли была ниже, чем у собак второй и, особенно, третьей группы. В большинстве полей зрения среза обнаруживались мелкие множественные очаги некроза, местами с тенденцией к слиянию. Некротические очаги были представлены бесструктурными эозинофильными гомогенными массами с небольшим количеством сегментоядерных лейкоцитов. Увеличение доли стромальных элементов опухоли выражено меньше, чем в других группах. Макрофагальная реакция в строме выражена слабо. Отмечается выраженная реакция со стороны соединительной ткани в виде пролиферации эндотелия сосудистой стенки. Сосудистая реакция выражена. Отмечены периваскулярные скопления элементов крови. Клеточные элементы около крупных сосудов мутные, набухшие, видимо, за счет пропитывания жидкостью. Отдельные клетки вакуолизированы. Указанные изменения характерны для воспалительной реакции.

При пальпации отмечена болезненность, контуры опухоли нечеткие, в связи с этим сложно судить об истинных размерах новообразования и степени его регрессии. Ткань вокруг опухолевых узлов отечна, рыхлая, иногда покрасневшая. У трех животных появились изъязвления на поверхности кожи над опухолевым узлом. Только одно животное погибло через 35 дней после лечения при признаках выраженной интоксикации и наличии множественных внутрикожных метастатических узелков в области брюшной стенки.

В целом, под влиянием неоадьювантной терапии во всех группах отмечен положительный патоморфоз новообразований молочной железы, заключающийся в снижении интенсивности митотической активности клеток на фоне активизации их гибели путем апоптоза и некроза. Максимальный терапевтический эффект от лечения сопровождался преобладанием процесса апоптоза, по сравнению с некрозом.

Анализ полученных результатов позволяет считать, что использование иммуномодулятора и аутогемотерапии способствуют индукции апоптоза опухолевых клеток, преимущественно с меньшей степенью дифференцировки, в то время как высококодифференцированные клетки более устойчивы. Очевидно, именно иммуностимулирующие манипуляции повышают и устойчивость клеток к некрозу, уравновешивая на гомеостатическом уровне отношения в сложной цепи взаимосвязей регуляторных механизмов митоза, апоптоза и некроза. Повышение интенсивности некроза до уровня апоптоза при монотерапии циклофосфаном можно рассматривать как нежелательный факт не только в связи с развитием осложнений, но и в связи с высокой вероятностью рецидива. По нашему мнению, это обусловлено тем, что, несмотря на гибель значительной части опухолевых клеток, те из них, которые выжили и остались способными к митозу, обладали высокой степенью атипии и низким уровнем дифференцировки на фоне выраженной сосудистой реакции и повышения проницаемости сосудистой стенки, что может способствовать метастазированию.

Таким образом, неоадьювантная терапия у собак со злокачественными новообразованиями молочной железы сопровождается закономерной динамикой соотношения

апоптического и некротического индекса в опухоли. Эти критерии вполне можно рассматривать в качестве патогенетического маркера эффективности лечения и прогноза опухолевого процесса. Необходимым условием для этого является определение уровня спонтанного апоптоза и некроза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Абдувалиев А.А., Гильдиева М.С. Дифференциальное окрашивание опухолевых клеток трипановым синим для определения апоптоза // Клиническая лабораторная диагностика. 2006. № 2. С. 36-38.
2. Бондарь Г.В., Седаков И.Е., Шлопов В.Г. Первично неоперабельный рак молочной железы. СПб.: Диалог, 2006. 304 с.
3. Ганцев Ш.Х., Хуснутдинов Ш.М. Патоморфология и морфологическая характеристика опухолевого роста. М.: Медицинское информационное агентство, 2003. 208 с.
4. Зарецкая А.И. Электронно-микроскопический анализ апоптоза клеток рака прямой кишки до и после облучения // Архив патологии. 1988. Т. 50. Вып. 1. С. 46-52.
5. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). М.: Медицина, 2001. 192 с.
6. Сидоренко Ю.С., Бордюшков Ю.Н. Нетрадиционные методы химиотерапии и их механизм действия // Мат-лы I съезда онкологов стран СНГ. М., 1996. Т. 2. С. 581.
7. Фильченков А.А., Стойков Р.С. Апоптоз и рак. Киев: Морион, 1999. 178 с.
8. Kerr J.F., Searle R.J. Apoptosis: its nature and kinetic role // Radiation Biology in Cancer Research / 32nd Ann. Symp. Fundament. Cancer. Res. – New-York: Raven Press, 1980. – P. 367-384.
9. Levine E.L., Renehan A., Gossiel R. Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma // radiother. Oncol. – 1995. – Vol. 37. – P. 1-9.
10. Sen S., Dincalci M. Apoptosis-biochemical events and relevance to cancer chemotherapy // FEBS Letters. – 1992. – Vol. 307. – P. 122-127.
11. Stapper N.J., Stuschke M., Sak A., Stuben G. Radiation-induced apoptosis in human sarcoma and glioma cell lines // Int. J. Cancer. – 1995. – Vol. 62. – P. 58-62.
12. Yu C.L., Tsai M.H. Fetal fetuin selectively induces apoptosis in cancer cell lines and shows anti-cancer activity in tumor animal models // Cancer Lett. – 2001. – Vol. 166. – N 2. – P. 173-184.

L. Timchenko, I. Sarkisyan, D. Areshidze

DYNAMICS AND PATHOGENETIC VALUE APOPTOSIS AND NECROSIS CAGES IN A TUMOUR OF A MAMMARY GLAND AT DOGS IN PROCESS NEOADJUVANT THERAPIES

Abstract: Neoadjuvant therapy at a tumour of a mammary gland at dogs is accompanied by natural dynamics of a parity apoptosis and necrosis. These criteria can be considered as a pathogenetic marker of efficiency of treatment and the forecast of tumoral process. A necessary condition for this purpose is definition of level spontaneous apoptosis and necrosis.

Keywords: apoptosis, necrosis, tumor, mammary gland, neoadjuvant therapy.