

## EKSPERIMENTINIAI TYRIMAI

### Epidermoidinės plaučių karcinomos elektrochemoterapinio poveikio histologinis tyrimas

Sonata Šalomskaitė-Davalgienė, Mindaugas Saulius Venslauskas, Neringa Paužienė<sup>1</sup>

Vytauto Didžiojo universiteto Biologijos katedra,

<sup>1</sup>Kauno medicinos universiteto Žmogaus anatomijos katedra

**Raktažodžiai:** elektrochemoterapija, elektroporacija, navikas, citotoksinis preparatas, histologinė analizė.

**Santrauka.** Stipriais elektriniais laukais veikiant navikines ląsteles, jų plazminėje membranoje atsiranda mikroporų, per kurias citotoksinis preparatas lengviau prasiskverbia į ląstelės vidų ir dėl to pastebimai sustabdo naviko augimą. Šis reiškinys buvo pavadintas elektrochemoterapiniu veikimu. Tyrinėjant elektrochemoterapijos poveikio sukeltus plaučių epidermoidinės karcinomos, įskiepytos pelėms į poodį, histologinius pakitimus optinės ir elektroninės mikroskopijos metodais, nustatyta, kad po gydymo naviko ląstelių ir branduolių membranos praranda vientisumą, nutrūksta ryšiai tarp ląstelių, audinyje susidaro nekrozės židiniai, atsiranda bebranduolių ląstelių – “šešėlių”. Nekrozės sričių plotas priklauso nuo elektrinio lauko stiprumo.

#### Įvadas

Stipriais elektriniais laukais ( $U > 1$  kV/cm) veikiant gyvų ląstelių suspensiją, ląstelių plazminėse membranose atsiranda mikroporų, per kurias į ląstelių vidų lengviau patenka didesnės molekulinės masės junginiai (1–6). Šis metodas buvo pavadintas elektroporacija (2, 4, 5). Nustatyta, jog dėl elektroporacijos antinavikiniai vaistai lengviau patenka į naviko ląsteles ir pastebimai sustabdo naviko augimą. Toks navikinio audinio augimo slopinimas buvo pavadintas *elektrochemoterapija* (EChT) (7–9). Pirmieji elektrochemoterapijos metodą navikams gydyti pritaikė O.Okino (5) ir L.M.Mir (4).

Lietuvoje šis metodas buvo patobulintas Vytauto Didžiojo universiteto Biologijos katedroje ir pritaikytas epidermoidinei plaučių karcinomai (Lewis Lung Carcinoma – LLC) ir B16 melanomai gydyti (1, 6).

Aukščiau minėtuose darbuose naviko EChT slopinimas buvo vertinamas matuojant naviko tūrio kitimą (1, 3, 6). Tūris  $V$  buvo apskaičiuojamas, išmatavus tris vienas kitam statmenus naviko diametrus  $a$ ,  $b$ ,  $c$ , pagal formulę:

$$V = a \times b \times c \times \pi / 6 \quad (1),$$

kur:  $V$  – naviko tūris,  $a$ ,  $b$ ,  $c$  – vienas kitam statmeni naviko diametrai.

Taikant šį metodą, galima įvertinti naviko dydžio

kitimą, tačiau negalima nustatyti morfologinių pakitimų naviko viduje (10).

Šio darbo tikslas – histologiniais metodais įvertinti epidermoidinės plaučių karcinomos (EPK) morfologinius pakitimus veikiant elektrochemoterapija antinavikinis vaistas (bleomicinas). Tyrimo objektu pasirinktos eksperimentinės pelės (9).

#### Tyrimo medžiaga ir metodai

Pirminiams eksperimentiniams tyrimams naudotos  $C_{57}Bl$  linijos pelės, kurioms į poodį buvo įskiepyta epidermoidinė plaučių karcinoma. Gydymas pradėtas po įskiepijimo praėjus 7–10 parų, kai navikų diametras buvo 5–7 mm. Pelėms į uodegos veną buvo sušvirkščinama bleomicino (5 mg/kg, 10 mg/kg ir 25 mg/kg), ištirpinto 0,9 proc. NaCl tirpale. Praėjus 3–4 min. po injekcijos, navikai buvo veikiami aštuonių, kas sekundę (1 Hz dažniu) pasikartojančių, stačiakampių impulsų serija.

Tiriant EChT poveikį, bandyta išsiaiškinti, kaip naviko morfologiniai pokyčiai priklauso nuo elektrinio lauko stiprumo. Eksperimentams taikyti tokie skirtingo intensyvumo laukai:

- 1)  $U = 1100$  V/cm;  $\tau = 0,1$  ms; 0,25 ms; 0,5 ms;
- 2)  $U = 1300$  V/cm;  $\tau = 0,1$  ms; 0,25 ms; 0,5 ms;
- 3)  $U = 1500$  V/cm;  $\tau = 0,1$  ms; 0,25 ms; 0,5 ms;

kur:  $U$  – elektrinio lauko stiprumas,  $\tau$  – elektrinio impulso trukmė.

Kontrolinės grupės navikams gydymo neskirta. Analizei navikai buvo paimami po gydymo praėjus trims paroms. Medžiaga ištirta šviesiniu ir elektroniniu mikroskopais.

**Šviesinė mikroskopija.** Medžiaga buvo paruošta dviem skirtingais metodais, kurie įgalino atlikti išsamią navikinio audinio histologinę analizę.

**1 metodas. Dažymas metileno mėliu.** Tiriami navikų gabalėliai buvo fiksuojami 4°C temperatūroje 2,5 proc. gliutaraldehido 0,1 M kakodilatiname buferyje (pH – 7,4) bei 1 proc. osmio tetraoksido tirpale kakodilatiname buferyje. Po dehidratacijos didėjančios koncentracijos etanolio tirpalais ir acetonu mėginiai įliejami į epoksidinių dervų (Epon 812 ir Araldit 502) mišinį.

Ultramikrotomu (Tesla BS – 490 A) buvo pjunami pusiau ploni (1  $\mu$ m storio) pjūviai ir 7 min. buvo dažomi metileno mėliu (pagal Ridgway).

**2 metodas. Dažymas hematoksilinu – eozinu.** EPK navikai buvo fiksuojami 4 proc. formalino fosfatinio buferio (pH 7,4) tirpale. Po fiksacijos audinys buvo dehidratuojamas didėjančios koncentracijos etanolio tirpalais, skaidrinamas ksilolo tirpale ir užliejamas histoplastu (Shandon). Mikrotomu (Reichert–Jung) pjaunami 4  $\mu$ m storio pjūviai, kurie dažomi hematoksilinu – eozinu (pagal Erlichą) (11).

**Elektroninė mikroskopija.** Tiriamų navikų gabalėliai įlieti į epoksidinių dervų mišinį pagal anksčiau aprašytą pirmąjį metodą buvo naudojami ultrastruktūriniai tyrimams.

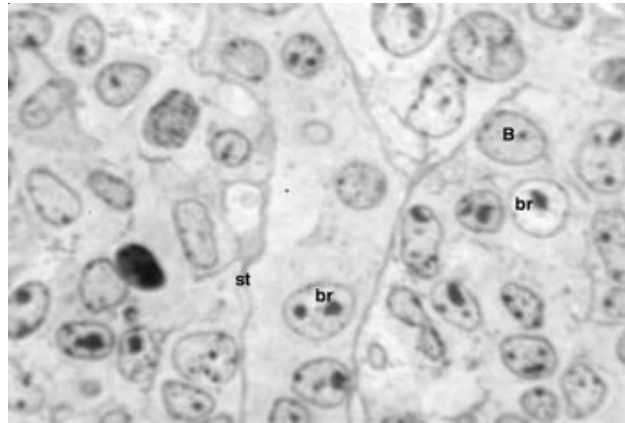
Ultramikrotomu (LKB Ultratome) pjaunami ultraploni (60–80 nm storio) pjūviai, kurie dažomi uranilacetatu ir švino citratu. Medžiaga tirta elektroniniu mikroskopu “Tesla BS – 500”.

### Tyrimo rezultatai

Histologinė navikų (EPK) analizė šviesiniu ir elektroniniu mikroskopais parodė, kad elektrochemoterapinis gydymas navikiniame audinyje sukelia didelių morfologinių pakitimų lyginant su kontrole.

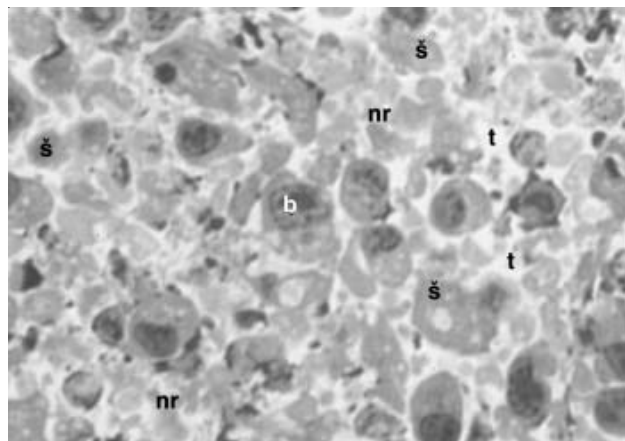
Kontrolinės grupės EPK navikuose matomas homogeniškas citoplazmos pasiskirstymas. Tiriant šviesiniu mikroskopu ląstelių ribų nematyti, tačiau aiškiai galima atskirti branduolių kontūrus (1 pav.). Navikinių ląstelių branduoliai esti įvairios formos: netaisyklingo apskritimo, elipsės, kartais pailgi su vienu ar net keliais branduolėliais. Būtent branduolių išsidėstymas rodo netvarkingą navikinio audinio struktūrą (1 pav.).

Po elektrochemoterapinio gydymo matomi na-



**1 pav. Epidermoidinės plaučių karcinomos, dažytos metileno mėliu, kontrolinis vaizdas**

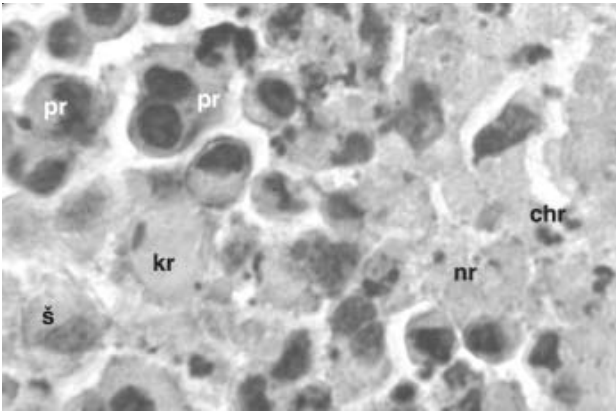
Pjūvio storis – 1  $\mu$ m, padidinimas –  $\times 40$ , B – branduolys, br – branduolėlis, st – naviko stroma.



**2 pav. Navikinio audinio, dažyto metileno mėliu, morfologiniai pakitimai po elektrochemoterapijos ( $U=1300$  V/cm,  $\tau=0,1$ ms + 25 mg/kg bleomicino)**

Pjūvio storis – 1  $\mu$ m, padidinimas –  $\times 40$ , t – tarpląsteliniai tarpai, š – ląstelės – “šešėliai”, nr – suirusių ląstelių masė, b – nesuiręs branduolys.

vikinio audinio morfologiniai pakitimai (2 pav.). Ryšiai tarp ląstelių nutrūkę, matomi dideli tarpląsteliniai tarpai. Kai kur navikinėse ląstelėse dar galima pastebėti nesuirusius, tačiau padidėjusius branduolius. Yra plotelių, kuriuose matomos tik bebranduolės ląstelės – “šešėliai”, o kitur tik bestruktūrė nekrotizavusių ląstelių masė. Vietomis galima pastebėti pavienes ląsteles su nesuirusiais branduoliais (2 pav.). Nesuirusio navikinio audinio, su kontrolei būdinga struktūra, išlikę tik nedideli ploteliai. Juose galima pastebėti nekrozę ir paranekrozę, kuriai būdinga padidėję, tačiau dar išlaikę savo struktūrą branduoliai (3 pav.). Yra plotelių, kuriuose matomos labai padidėjusios, lyginant su kontrole, navikinės ląstelės. Nekrozės srityse



**3 pav. Navikinio audinio, dažyto hematoksilinu eozinu, morfologiniai pakitimai po elektrochemoterapijos ( $U=1300$  V/cm,  $\tau=0,1$  ms + 10 mg/kg bleomicino)**

Pjūvio storis – 4  $\mu$ m, padidinimas –  $\times 40$ , chr – chromatino gabalėliai, kr – kraujosruvos, nr – nekrozės, pr – paranekrozės sritys, š – ląstelės – “šešėliai”.

tarp bestruktūrės suirusių ląstelių masės matomi įvairaus dydžio suirusių branduolių fragmentai (suskondensavęs chromatinas). Kai kur matomos kraujosruvos (3 pav.). Veikiant žymiai stipresniais elektriniais laukais ( $U=1700$  V/cm), pastebimas dalinis arba visiškas navikinio audinio suirimas (fotografija nepateikiama).

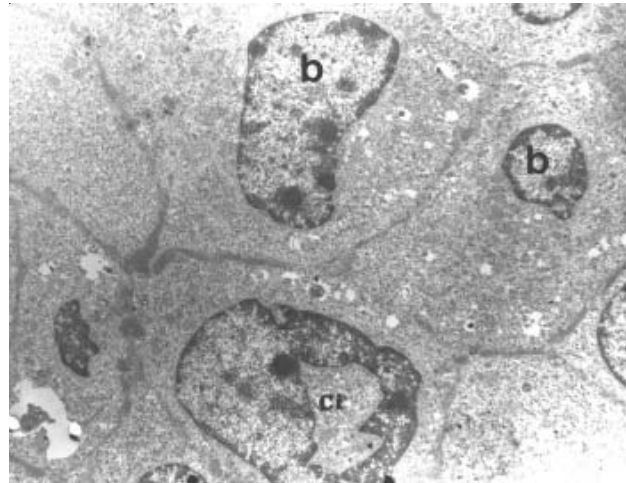
Elektroninės mikroskopijos kontrolinės grupės EPK naviko preparatuose matomi ląstelių kontūrai ir netaisyklingos formos jų branduoliai (4 pav.). Kai kuriems branduoliams būdingos gijos branduolio apvalkalo invaginacijos. Dažnas ir navikinėms ląstelėms būdingas branduolėlio slinkimas į branduolio kraštą bei didesnis branduolėlių skaičius (4 pav.).

Elektrochemoterapiškai gydytų EPK navikų ultrastruktūra gerokai skiriasi nuo kontrolinių. Matomas nehomogeniškas citoplazmos pasiskirstymas. Pastebimos sritys, kuriose ląstelės praranda plazminės membranos vientisumą, todėl citoplazma atrodo tarsi “išsiliejusi” išorėn. Kai kur matoma amorfinė grūdėta žuvusių ląstelių masė. Nuotraukoje matomas branduolys, irstantis karioreksės būdu, t.y. kai branduolyje esantis chromatinas kondensuojasi į atskirus fragmentus (5 pav.).

### Rezultatų aptarimas

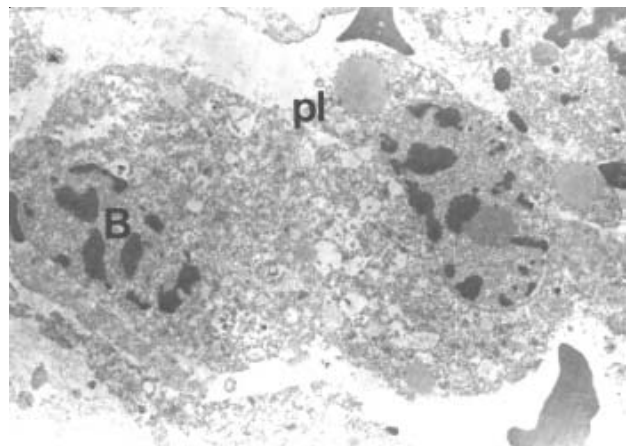
Šio tyrimo duomenimis, elektrochemoterapija, t.y. navikų gydymas bleomicinu, kurio patekimą į EPK ląsteles palengvina elektroporacija, sukėlė masyvią navikinio audinio nekrozę.

Skirtingų navikinio audinio dažymo (metileno mėliu ir hematoksilinu eozinu) metodų analizė suteikia



**4 pav. Epidermoidinės plaučių karcinomos elektroninės mikroskopijos kontrolinis vaizdas**

Padidinimas –  $\times 6000$ , b – branduolys, ci – citoplazminė išauga.



**5 pav. Navikinio audinio elektroninės mikroskopijos morfologiniai pakitimai po elektrochemoterapijos ( $U=1300$  V/cm,  $\tau=0,1$  ms + 25 mg/kg bleomicino)**

Padidinimas –  $\times 6000$ , B – branduolys, pl – pažeista ląstelės plazminė membrana.

išsamios informacijos apie navikinio audinio pakitimus, vykstančius po elektrochemoterapijos.

Kontrolinės grupės EPK audinyje matomos ne tik branduolių, bet ir ląstelių ribos. Navikinės ląstelės esti labai arti viena kitos, netaisyklingos formos su įvairaus dydžio citoplazminėmis išaugomis, kurios prasiskverbia tarp ląstelių (4 pav.). Elektrochemoterapiškai gydytuose EPK navikuose būna didelės nekrozės sritys ir mažas kiekis nesuirusių navikinių ląstelių. Elektronogramos rodo, kad ląstelių ir branduolių membranos praranda vientisą struktūrą, ląstelės suyra (5 pav.), o kontrolinės grupės navikuose nesuirusios



ląstelės sudaro pagrindinę navikinio audinio masę. Minėtąjį poveikį sukelia net mažiausio stiprumo ir trukmės laukai ( $U=1100$  V/cm,  $t=0,1$  ms), naudoti mūsų ir kitų autorių atliekamų tyrimų metu (1, 3, 6).

Histologinė preparatų analizė parodė, kad, taikant stipresnius elektrinius impulsus ( $U=1300$  V/cm ir  $U=1500$  V/cm) kartu su bleomicinu, pastebimos didesnės navikinio audinio nekrozės zonos ir gausesnės kraujosruvos. Esminių skirtumų navikiniame audinyje po elektrochemoterapinio gydymo, naudojant skirtingus  $1300$  V/cm ir  $1500$  V/cm elektrinius impulsus, nepastebėta. Visiškas naviko suirimas matomas naudojant  $1700$  V/cm elektrinius impulsus,  $0,1$  ms trukmės.

Ankstesnių tyrimų metu slopinamas navikų augimo elektrochemoterapijos poveikis įrodytas išoriškai matuojant gydomo naviko tūrį (1, 6). Tačiau išorinis matavimas nesuteikia informacijos apie naviko viduje vykstančius histologinius pakitimus, kurie lemia navikų tūrio mažėjimą. Todėl histologiniai navikų augimo slopinimo tyrimai kartu su jų tūrio matavimais pateikia išsamesnį EChT vaizdą ir suteikia informacijos apie citologines naviko irimo priežastis.

Elektrochemoterapinio gydymo poveikis įrodytas

dirbant su eksperimentiniais gyvūnais (1, 4–6). Neseniai šis naujas gydymo metodas pritaikytas klinikoje gydant galvos ir kaklo odos karcinomą, piktybinę melanomą, adenokarcinomą (8, 12).

### Išvados

1. Optinė mikroskopinė epidermoidinės plaučių karcinomos analizė rodo, jog po elektrochemoterapijos nutrūksta ryšiai tarp ląstelių, padidėja tarpląsteliniai tarpai, atsiranda bebranduolių ląstelių, kraujosruvų. Elektroninė mikroskopija įgalina matyti gydytų navikinių ląstelių ir jų branduolių membranų trūkumus.

2. Po EChT gydymo matomi nekrozės plotai priklauso nuo impulsinio elektrinio lauko charakteristikų. Taikant  $1300$  V/cm,  $0,5$  ms ir  $1500$  V/cm,  $0,5$  ms elektrinius laukus, elektrochemoterapinis poveikis didžiausias.

3. Atlikti histologiniai tyrimai pagrindžia ankstesnių mūsų darbų (1, 6) išoriškai pastebėtą elektrochemoterapiškai gydytų navikų tūrio mažėjimą.

**Padėka.** Dėkojame Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui už paramą vykdant šį mokslinį tyrimą.

## Histological analysis of electrochemotherapy influence on Lewis Lung Carcinoma

Sonata Šalomskaitė-Davalgienė, Mindaugas Saulius Venslauskas, Neringa Paužienė<sup>1</sup>

Department of Biology, Vytautas Magnus University,

<sup>1</sup>Department of Human Anatomy, Kaunas University of Medicine, Lithuania

**Key words:** electrochemotherapy, electroporation, tumor, cytotoxic agent, histological analysis.

**Summary.** Under the influence of strong electric fields the permeability of tumor cell membranes to poor permeating drugs increases and as a result the tumor growth is inhibited. This new tumor treatment method is named electrochemotherapy. We investigated the electrochemotherapy influence of bleomycin upon mice Lewis Lung Carcinoma by using optical histological and electron microscopic tumor analysis. It was shown that due to electrochemotherapy tumor necrosis area is significantly increased, intercellular gaps enlarge, and a big amount of cells is destroyed. Cell and nucleus membranes break as well as hemorrhage are very often. The observable histological tumor change was noted when electrical pulses of  $1300$  V/cm and  $0.1$  ms duration were applied. Pulses of  $1700$  V/cm and  $0.1$  ms duration induce total tumor destruction.

Correspondence to S.Šalomskaitė-Davalgienė, Department of Biology, Vytautas Magnus University, Vileikos 8, 3035 Kaunas, Lithuania. E-mail: afsosa@vaidila.vdu.lt

### Literatūra

1. Šatkauskas S, Keršienė R, Didžiapetrienė J, Venslauskas MS. Antinavikinio elektrochemoterapijos efektyvumo įvertinimas gydant plaučių epidermoidinę karcinomą LL *in vivo*. (Evaluation of antitumor effectiveness of electrochemotherapy on Lewis Lung Carcinoma in mice.) *Medicina* 1998;34:668-73.
2. Belehradec JJr, Orłowski S, Ramirez LH, Pron G, Poddevin B, Mir LM. Electroporation of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin. *Biochim Biophys Acta* 1994;1190:155-63.
3. Mir LM, Orłowski S, Belehradec JJr, Teissie J, Domenge C, Miklavčič D, et al. Biomedical applications of electric pulses with special emphasis on antitumor electrochemotherapy. *Bioelectrochem Bioenerg* 1995;38:203-7.
4. Mir LM, Orłowski S, Belehradec JJr, Paoletti C. Electro-

- chemotherapy: potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 1991;27:68-72.
5. Okino M, Mohri H. Effects of a high – voltage electrical impulses and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *Jpn J Cancer Res* 1987;78:1319-21.
  6. Šatkauskas S, Keršienė R, Venšlauskas MS. The search for optimal electrochemotherapy conditions. *Biologija* 1998;4:64-9.
  7. Čemažar M, Miklavčič D, Serša G. Intrinsic sensitivity of tumor cells to bleomycin as an indicator of tumor response to electrochemotherapy. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:328-33.
  8. Mir LM, Glass LF, Serša G, Teissie J, Domenge C, Miklavčič D, et al. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumors by electrochemotherapy. *Journal of Cancer* 1998;77:2336-42.
  9. Yabushita H, Yoshikawa K, Hirata M, Furuya H, Hojyoh T, Fukatsu H, et al. Effects of electrochemotherapy on CaSki cells derived from a cervical squamous cell carcinoma. *Pathol Oncology* 1997;65:297-303.
  10. Sato T, Takusagawa K, Asoo N, Ariji F, Shida K, Kumano N, et al. Ultrastructure of the Lewis Lung Carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1982;18:369-76.
  11. Kublickienė O. *Histologinė technika ir praktinė histochemija. (Histological technic and practical histochemistry)*. Vilnius; 1978.
  11. Heller R, Gilbert R, Jaroszeski MJ. Clinical applications of electrochemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999;35:119-29.

*Straipsnis gautas 2000 08 22, priimtas 2002 03 15*  
*Received 22 August 2000, accepted 15 March 2002*