

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ЗОНЫ АБДОМИНАЛЬНОЙ ЛИМФОДИСЕКЦИИ ПОСЛЕ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

В.Ю. Кравцов^{1,2}, Е.С. Пирожено¹, К.В. Павелец^{2,3,4}, М.А. Протченков^{2,4}, У.А. Дрозд³

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

²Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴Городская Мариинская больница, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Проведены цитологические исследования материала лимфатических узлов зоны абдоминальной лимфодиссекции после интраоперационной фотодинамической терапии (ИОФДТ) при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта. Установлено, что в результате проведения ФДТ клетки метастатических опухолей разрушаются с исчезновением цитоплазматической мембраны и цитоплазмы, при этом остаются только интерфазные ядра («голые ядра») ($p < 0,0001$). Также представлено цитологическое подтверждение апоптоза (наличие апоптотических телец) в лимфатических узлах с метастазами после курсов ИОФДТ в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, цитопатология, интерфазные ядра, апоптоз, радахлорин, фотодитазин.

Для цитирования: Кравцов В.Ю., Пирожено Е.С., Павелец К.В., Протченков М.А., Дрозд У.А. Цитологические эффекты в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции после интраоперационной фотодинамической терапии при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта // Biomedical photonics. – 2018. – Т. 7, № 4. – С. 11–15. doi: 10.24931/2413-9432-2018-7-4-11-15.

Контакты: Кравцов В.Ю., e-mail: kvyspb@mail.ru

CYTOLOGICAL EFFECTS IN LYMPH NODES OF ABDOMINAL LYMPHODISSECTION ZONE AFTER INTRAOPERATIVE PHOTODYNAMIC THERAPY OF GASTROINTESTINAL CANCERS

Kravtsov V.Yu.^{1,2}, Pirozhenko E.S.¹, Pavelec K.V.^{2,3,4}, Protchenkov M.A.^{2,4}, Drozd U.A.³

¹Military Medical Academy of S.M. Kirov, Saint-Petersburg, Russia

²North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

³Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint-Petersburg, Russia

⁴Mariinsky hospital, St-Petersburg, Russia

Abstract

Cytological studies on lymph nodes of abdominal lymphodissection zone after local intraoperative photodynamic therapy (IOPDT) of gastrointestinal cancers were carried out. As a result of the PDT, the metastatic cells are destroyed, their cytoplasmic membranes and the cytoplasm disappears, leaving behind interphase nuclei ("naked nuclei") ($p < 0,0001$). Cytological confirmation of apoptosis (the presence of apoptotic bodies) in metastatic lymph nodes after IOPDT sessions on the lymph nodes of the abdominal lymphodissection zone is also presented.

Keywords: photodynamic therapy, cytopathology, interphase nucleus, apoptosis, radachlorin, fotoditazin.

For citations: Kravtsov V.Yu., Pirozhenko E.S., Pavelec K.V., Protchenkov M.A., Drozd U.A. Cytological effects in lymph nodes of abdominal lymphodissection zone after intraoperative photodynamic therapy of gastrointestinal cancers, *Biomedical photonics*, 2018, vol. 7, no. 4, pp. 11–15. (in Russ.) doi: 10.24931/2413–9432–2018–7–4–11–15.

Contacts: Kravtsov V.Yu., e-mail: kvyspb@mail.ru

Введение

В ранее опубликованной статье было описано исследование лимфатических узлов зоны абдоминальной лимфодиссекции, выполненной после интраоперационной фотодинамической терапии (ИОФДТ) с использованием фотосенсибилизатора (ФС) радахлорин или фотодитазин при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта для выявления апоптоза. С помощью ДНК-электорофореза было доказано, что апоптоз после ФДТ индуцируется в лимфатических узлах, поражённых метастазами, и не возникает в интактных лимфатических узлах ($p < 0,01$). Данный факт указывает на избирательную способность ФДТ вызывать гибель злокачественных клеток [1].

В настоящем исследовании цитологические препараты, использовавшиеся на предыдущих этапах исследования для выявления метастазов, были снова проанализированы под иммерсией. Целью данного ретроспективного исследования стали поиски цитологических проявлений апоптотического (апоптотические тельца) и некротического (цитонекроз, фагоцитарная инфильтрация) процессов в популяциях метастатических клеток лимфатических узлов, индуцированных ФДТ.

Материалы и методы

Группы обследованных пациентов и их диагнозы, процедура проведения сеансов ФДТ и получение цитологических препаратов из лимфатических узлов были подробно изложены в тексте статьи, опубликованной ранее [1].

Цитологические исследования проводили на препаратах, полученных отпечатыванием на стеклах облученных и необлученных частей лимфатических узлов.

Препараты окрашивали азур-эозином по Романовскому и микроскопировали под иммерсией ($\times 1000$) в проходящем свете. Частоту встречаемости аномальных клеток (ядер) определяли путём подсчёта 500–1000 опухолевых клеток и выражали в процентах.

Статистическую обработку данных проводили непараметрическими методами (U-критерий Уилкоксона-Манна-Уитни) с использованием программного пакета Statistica 13.3.

Результаты

В предыдущей статье были приведены результаты изучения 40 лимфатических узлов, полученных по вышеуказанной методике, в 23 из них были выявлены метастатические клетки, в 17 – отсутствовали. Методом ДНК-электорофореза апоптоз (апоптотические тельца) был обнаружен в 17 из 23 лимфатических узлов, поражённых метастазами [1].

Теперь можно утверждать, что цитологические исследования в мазках-отпечатках, проведённые в этих же 17 лимфатических узлах, выявили апоптотические тельца (рис. 1).

В процессе микроскопирования под иммерсией был обнаружен резкий контраст в частоте встречаемости так называемых «голых ядер» (ГЯ) злокачественных метастатических клеток между облучёнными и необлучёнными половинами лимфатических узлов. Это явление отмечено как в случае плоскоклеточной, так и железистой структуре злокачественной опухоли. У ядер в обоих случаях наблюдался четкий ровный контур, характер окрашивания и структура хроматина соответствовали интактным клеткам с

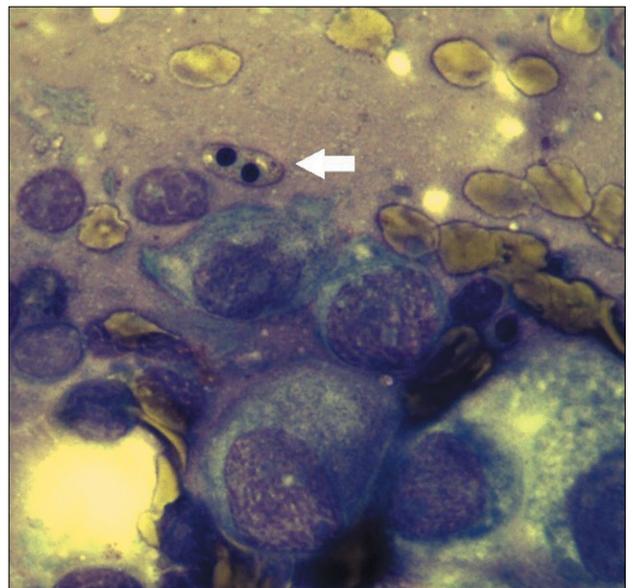


Рис. 1. Апоптотические тельца метастатических клеток аденокарциномы желудка в лимфатических узлах после проведения сеанса ФДТ

Fig. 1. Apoptotic bodies of metastatic cells in the lymph nodes of adenocarcinoma of stomach after PDT session

цитоплазмой и мембраной (рис. 2а). Наблюдаемые нами «голые ядра» имели как одиночное расположение (рис. 2б), так и были ассоциированы в виде виноградных гроздей, что, вероятно, соответствовало индукции «голых ядер» одновременно и сразу после облучения комплексов метастатических клеток (рис. 2).

Анализ частоты встречаемости ГЯ метастатических клеток в облученных и необлученных лимфатических узлах с метастазами у 15 пациентов с аденокарциномой и 19 пациентов с плоскоклеточным раком выполнены в программе STATISTICA и представлены на гистограммах (рис. 3,4).

Очевидно, что воздействие ИОФДТ значительно повышает количество «голых ядер» ($p < 0,0001$, U-критерий Уилкоксона-Манна-Уитни).

Таким образом, нами было получено цитологическое подтверждение апоптоза (наличие апоптотических телец) в лимфатических узлах с метастазами после ИОФДТ, который был выявлен нами ранее методом ДНК-электрофореза [1]. А также, с нашей точки зрения, это самое главное, в ходе данного исследования был обнаружен эффект «под лучом», проявлявшийся в виде индукции «голых ядер» метастатических клеток после завершения ФДТ.

Цитологические доказательства гибели опухолевых клеток путем апоптоза и некроза позволяют сделать вывод о способности ИОФДТ повышать абластичность операций и улучшать онкологические результаты резекционных вмешательств по поводу местнораспространенных злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта.

Обсуждение

Очевидно, что наблюдаемые ФДТ-индуцированные «голые ядра» могли возникнуть только в случаях,

когда клетки получили повреждения в цитоплазме (лизосомах, митохондриях, аппарате Гольджи и эндоплазматической сети) и цитоплазматической мембране, но никак не внутри и даже не на поверхности клеточного ядра. Интактность ядра при ФДТ была отмечена при исследовании субклеточной локализации фоскана в линии аденокарциномы человека MCF-7 М.Н. Teiten с соавт. [2]. Авторы с помощью конфокальной микроскопии и микроспектрофлуорометрии показали, что данный ФС незначительно накапливается в лизосомах и митохондриях и в основном локализуется в аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме, не затрагивая при этом ядро. Согласно данным исследования А.Р. Castano и соавт., ФС локализуются в митохондриях, лизосомах, эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи и в плазматической мембране [3]. С. Фаррахова с соавт. изучали локализацию хлорина e_6 и его диметилового эфира в клетках HT29 аденокарциномы человека и установили, что данные фотосенсибилизаторы в основном распределены в плазматической мембране и цитоплазме клеток и практически не накапливаются в области локализации клеточного ядра [4].

Вместе с тем, L.S. Fontana с соавт. получили неоднозначные результаты при исследовании внутриклеточной локализации ФС фотодитазин в клеточной линии глиобластомы 9L/LacZ. Флуоресцентная микроскопия показала диффузное накопление ФС во всей клетке, но нельзя было сказать точно аккумулируется ли ФС в ядре. Сам автор считает, что ложноположительный результат мог быть связан ассоциацией фотодитазина к ядерной мембране [5]. L.S. Fontana также столкнулся с феноменом индукции «голых ядер» и дал им описание, полностью совпадающее с описанием, изложенным нами ранее [6]. Первое же

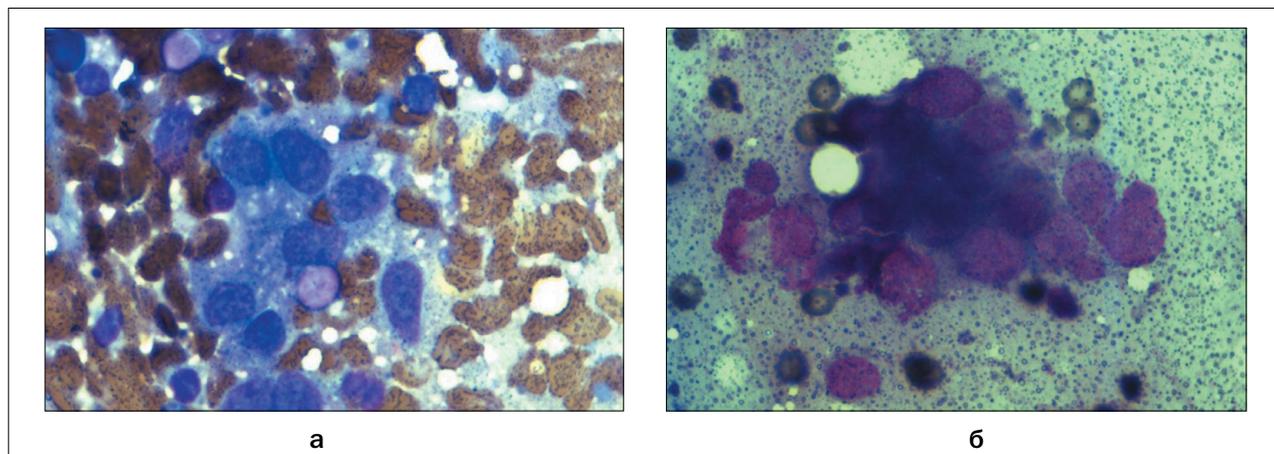


Рис. 2. Мазки-отпечатки метастатических клеток в лимфатическом узле 9А зоны абдоминальной лимфодиссекции до облучения (а) и после завершения (б) сеанса интраоперационной фотодинамической терапии, выполняемой аппаратом «Фара-2» в течении 20 мин (окрашивание азур-эозином по Романовскому, увеличение: $\times 1000$)

Fig. 2. Imprint smear of metastatic cells in the lymph node (9A) of the abdominal lymph node dissection zone before (a) and after (б) intraoperative PDT session carried out using «Fara-2» device for 20 minutes (staining with azur-eosin by Romanovsky, magnification: $\times 1000$).

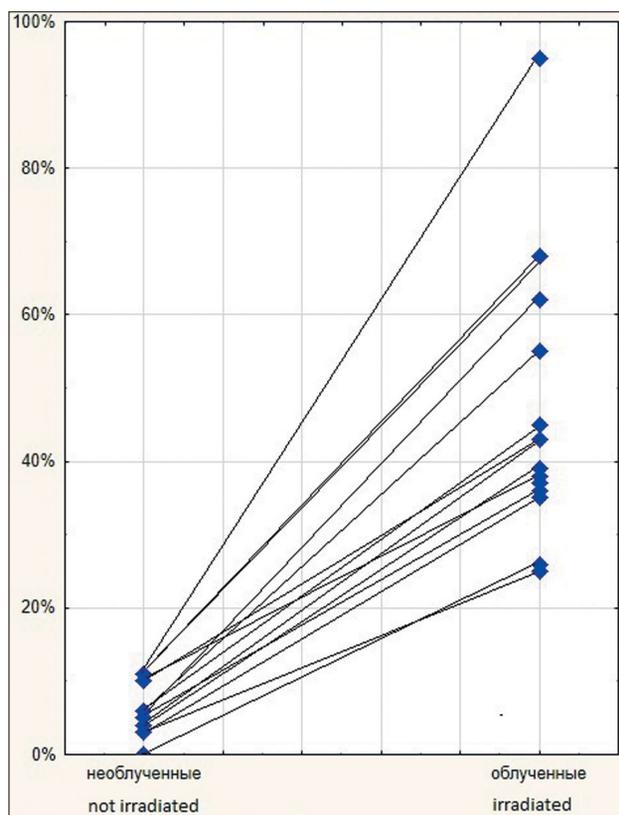


Рис. 3. Распределение половин лимфатических узлов по показателю «частота встречаемости "голых ядер"» при железистом раке

Fig. 3. Distribution of halves of lymph nodes according to the "frequency of occurrence of "naked nuclei" with glandular cancer

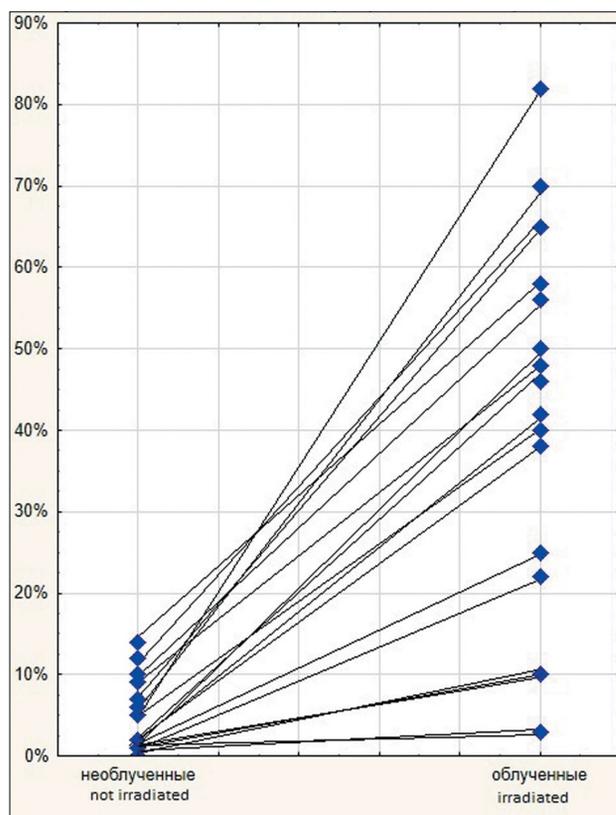


Рис. 4. Распределение половин лимфатических узлов по показателю «частота встречаемости "голых ядер"» при плоскоклеточном раке

Fig. 4. Distribution of halves of lymph nodes according to the "frequency of occurrence of "naked nuclei" with squamous cell carcinoma

сообщение об индукции ГЯ при ФДТ, которое нам удалось найти в поисковой системе PubMed приведено в китайском издании исследователем Y.T. Zhou и соавт. [7]. Следует отметить, что «голые ядра» L.S. Fontana и «голые ядра» Y.T. Zhou были индуцированы ФДТ в клеточных культурах *in vitro*.

Несмотря на то, что данные Fontana L.S. указывают на ассоциацию ФС с ядром, очевидно, что наличие радахлорина на поверхности ядра ещё недостаточно для его деструкции после фотоактивации.

Радиус поражения активированного ФС в субклеточном масштабе относительно мал [2, 3, 8, 9]. Высокая реакционная способность и короткий период полувыведения синглетного кислорода и гидроксильных радикалов напрямую влияют только на молекулы и структуры, которые находятся вблизи области ее производства (области локализации ФС). Период полувыведения синглетного кислорода в биологических системах составляет <40 нс, поэтому радиус действия синглетного кислорода составляет порядка 20 нм [2], в то время как толщина ядерной оболочки

(34–74 нм) в несколько раз превосходит возможный радиус поражения фотосенсибилизатора, поэтому ядро после ФДТ в целом сохраняет свою форму.

Заключение

ИОФДТ, проводимая у пациентов со злокачественными новообразованиями желудочно-кишечного тракта вызывает эффект «под лучом», проявляющийся в индукции «голых ядер» метастатических клеток абдоминальных лимфатических узлов зоны лимфодиссекции. В ходе проведенного исследования представлено цитологическое подтверждение апоптоза (наличие апоптотических телец) в лимфатических узлах с метастазами после сеансов ФДТ в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции. Применение ИОФДТ в клинических условиях повышает абластичность операций и онкологическую результативность хирургического лечения местнораспространенных форм рака желудочно-кишечного тракта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Павелец К.В., Орёл В.И., Кравцов В.Ю. и др. Изучение апоптоза в лимфатических узлах зоны абдоминальной лимфодиссекции после интраоперационной фотодинамической терапии при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта // *Biomedical Photonics*. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 39–44.
2. Teiten M.H., Bezdetnaya L., Morliere P., et al. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells // *Br J Cancer*. – 2003. – Vol. 88. – P. 146–152.
3. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagnosis Photodyn Ther*. – 2004. – Vol.1, No. 4. – P. 279–293.
4. Фаррахова Д.С., Яковец М.В., Лощенов В.Б. и др. Исследование распределения хлориновых фотосенсибилизаторов в двухмерных и трехмерных клеточных культурах // *Biomedical Photonics*. – 2017. – Т. 6, № 2. – С. 4–11.
5. Fontana L.C., Pinto J.G., Pereira A.H.C., et al. Photodithazine photodynamic effect on viability of 9L/lacZ gliosarcoma cell line // *Lasers Med Sci*. – 2017. – Vol. 32, No. 6. – P. 1245–1252.
6. Павелец К.В., Кравцов В.Ю., Протченков М.А. и др. Первый опыт применения интраоперационной флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии в абдоминальной онкологии // *Biomedical Photonics*. – 2015. – С. 1. – С. 69–70.
7. Zhou Y.K., Wu W.Z., Zhang L., et al. Effect of M007 mediated photodynamic therapy on proliferation of human osteosarcoma MG63 cells in vitro // *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. – 2012. – Vol. 43, No. 1. – P. 41–45.
8. Moan J., Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen // *Photochem Photobiol*. – 1991. – Vol. 53, No. 4. – P. 549–553.
9. Kessel D., Luol Y., Deng Y., Chang C.K. The Role of Subcellular Localization in Initiation of Apoptosis by Photodynamic Therapy // *Photochemistry and Photobiology*. – 1997. – Vol. 65, No. 3. – P. 422–426.

REFERENCES

1. Pavelec K.V., Orel V.I., Kravtsov V.Y., Protchenkov M.A., Dysin A.V., Drozd U.A., Kuzmina T.I., Kostina U.D., Pavelec M.K., Rusanov D.S., Lacko E.F. Apoptosis in the lymph nodes of the abdominal lymphodissection zone after local intraoperative photodynamic therapy of gastrointestinal cancers, *Biomedical Photonics*, 2017, vol. 6, no. 3, pp. 39–44. (In Russian)
2. Teiten M.H., Bezdetnaya L., Morliere P., Santus R., Guillemin F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells, *Br J Cancer*, 2003, vol. 88, pp. 146–152.
3. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2004, vol.1, no. 4, pp. 279–293.
4. Farrahova D.S., Yakovets M.V., Loshchenov V.B., Bolotina L.N., Zorin V.P. Investigation of chlorin photosensitizers distribution in monolayer and spheroid cell cultures, *Biomedical Photonics*, 2017, vol. 6, no. 2, pp. 4–11. (In Russian)
5. Fontana L.C., Pinto J.G., Pereira A.H.C., Soares C.P., Raniero L.J., Ferreira-Strixino J. Photodithazine photodynamic effect on viability of 9L/lacZ gliosarcoma cell line, *Lasers Med Sci*, 2017, vol. 32, no. 6, pp. 1245–1252.
6. Pavelets K.V., Kravtsov V.Yu., Protchenkov M.A., Savinov I.P., Vitaleva U.A., Rusanov D.S., Fedorova P.S., Pavelets M.K., Kostina Yu.D. First experience of using intraoperative fluorescent diagnostics and photodynamic therapy in abdominal oncology, *Biomedical Photonics*, 2015, S. 1, pp. 69–70. (In Russian)
7. Zhou Y.K., Wu W.Z., Zhang L., Yang C.H., Wang Y.P. Effect of M007 mediated photodynamic therapy on proliferation of human osteosarcoma MG63 cells in vitro, *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2012, vol. 43, no. 1, pp. 41–45.
8. Moan J., Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen, *Photochem Photobiol*, 1991, vol. 53, no. 4, pp. 549–553.
9. Kessel D., Luol Y., Deng Y., Chang C.K. The Role of Subcellular Localization in Initiation of Apoptosis by Photodynamic Therapy, *Photochemistry and Photobiology*, 1997, vol. 65, no. 3, pp. 422–426