

С.А.Лисенко

Вінницький національний  
медичний університет ім.  
М.І.Пирогова

**Ключові слова:** пухлинний  
ангіогенез, опромінення,  
деградація, гістоморфомет-  
рія, багатомірний аналіз,  
щільність судин.

Надійшла: 26.04.2007

Прийнята: 04.06.2007

УДК: 591.41/4:616-006:57.008.5

## ЯКІСНА ТА КІЛЬКІСНА ХАРАКТЕРИСТИКА АНГІОГЕНЕЗУ В ОПРОМІНЕНИХ ПУХЛИННИХ ТРАНСПЛАНТАТАХ У ЩУРІВ

*Робота виконувалась в рамках планової науково-дослідної роботи „Клініко-морфологічні аспекти діагностики, лікування та реабілітації хворих на злоякісні новоутворення” (№ держреєстрації 0104U002842).*

**Резюме.** Представлено якісні та кількісні результати морфологічного дослідження ангіогенезу експериментальної пухлини Герена під впливом променевої терапії по інтенсивній методиці. Проведено мікроскопічний та морфометричний аналіз мікросудин в інтактних та опроміненних пухлинних трансплантатах у 80 безпорідних щурів обох статей. Для статистичної обробки використано багатомірні процедури генералізованих лінійних моделей системи SAS. За допомогою світлової та електронної мікроскопії виявлено загальну дегенерацію паренхіми та судинного русла пухлин і ознаки гальмівного ефекту опромінення на ріст судин. При гістоморфометричному обчисленні показників ангіогенезу встановлено, що в пухлинах тварин, які підлягали впливу телегаматерапії, достовірно зменшуються щільність судин і відношення площі судин до площі пухлини та суттєво збільшується середня площа однієї судини в порівнянні з пухлинами тварин контрольної групи. Такі зміни відбуваються в динаміці, тобто з ростом експериментальних пухлин з 12 по 28 добу після їх перевивки. Це свідчить про те, що променева терапія можливо має антиангіогенну дію.

### Lysenko S.A. Qualitative and quantitative characteristic of angiogenesis in tumour transplantants under the influence of radiation therapy in rats.

**Summary.** Qualitative and quantitative results of morphological investigation of experimental Geren's tumour angiogenesis under the influence of radiation therapy according to intensive technique are presented. Microscopic and morphometric analysis of vascular channel in control and radiation tumour transplantants in 80-th an race rats of both sex are executed. Multivariate procedures of generalization linear models of system SAS are used because of statistic processing. General degeneration of parenchyma and vascular channel of tumours as well as signs of inhibitory influence of radiation on vessel development were revealed by means of light and electronic microscopy. In histomorphometric estimation of angiogenesis parameters tumours of the animals subjected to telegamtherapy showed considerably decreased density of vessel's and relation area of vessel's to area of tumour and essentially increased mean area of one vessel in comparison with tumours of the animals comprising control group. Such changes occur in dynamics, i.e. with growth of experimental tumours from the 12-th to 28-th day after their transplantation. Therefore, radiation therapy it is possible has to antiangiogenic action.

**Key words:** tumour angiogenesis, radiation, degradation, histomorphometry, multivariate analysis, density of vessels.

#### Вступ

Відомо, що виникненню різних захворювань нерідко сприяє зміна ступеня васкуляризації органа або тканини. У випадку виникнення злоякісних новоутворень, неконтрольований надмірний ангіогенез є необхідною передумовою не лише для росту пухлин, але й для їх метастазування. Перехід злоякісної пухлини в фазу активного росту безпосередньо пов'язують із посиленням продукції стимуляторів ангіогенезу. Для підтримання росту пухлини абсолютно необхідно її подальше проростання кровоносними судинами. Пухлинні клітини продовжують продукувати ангіогенні фактори, які стимулюють появу нових кровоносних судин (Фільченков О.О, Стойка Р.С, 2006).

Неоваскуляризація часто корелює з біологічною агресивністю і злоякісністю пухлини і відчу-

тно впливає на клінічний перебіг і прогноз пухлинного процесу (Salvesen H. et al., 1999). Показниками, які характеризують ангіогенну активність пухлини та дають можливість вивчити особливості ангіогенезу у видалених пухлинах є, зокрема, інтратуморальна щільність мікросудин та рівень експресії і продукції фактора росту судинного ендотелію VEGF (Новак О.Є. та співавт., 2002). Доведено що, індекс васкуляризації відноситься до незалежного прогностичного критерію при злоякісних пухлинах шлунка, ракові ендометрія, інтраепітеліальному ракові шийки матки та інтраепітеліальній неоплазії вульви (Salvesen H. et al., 1999; Dobbs S. et al., 1997; Bancher-Todesca D. et al., 1997). Гірший прогноз для виживаності пацієнтів відмічається у разі високої щільності мікросудин на одиницю площі пухлини.

Вплив на систему судинного русла в пухлинах є одним із важливих підходів до контролю росту самих новоутворень. До новітніх стратегій лікування хворих онкологічного профілю відносяться зокрема протипухлинна антиангіогенна терапія, основна ціль якої не знищити ендотеліальні клітини, а інгібувати їх проліферацію, міграцію або диференціацію, реалізація яких призводить до формування нових кровоносних судин (Соляник Г.И., 2006). Тому ендотеліоцити, які діляться, є однією з головних мішеней дії інгібіторів ангіогенезу. Так, згідно J. Folkman (2002) антиангіогенний метод терапії забезпечує не лише пригнічення росту первинної пухлини, але також і її метастазів.

**Метою** даного дослідження був морфологічний та гістоморфометричний аналіз ангіогенезу в пухлині Герена під впливом променевої терапії по інтенсивній методиці впродовж місяця після трансплантації у щурів.

#### **Матеріали і методи**

Досліди виконані на 80 безпорідних щурах обох статей вагою 110-130 г та віком 2-3 місяці. Для моделювання пухлин використали штам експериментальної пухлини Герена, який був взятий з банку пухлин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Е. Кавецького НАН України. Утримання та маніпуляції з тваринами проводили у відповідності до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), а також згідно Положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). Кожній тварині однократно підшкірно вводили по 0,5 мл гомогенату пухлинної маси. Щури були розподілені на дві групи, в кожній по 40 тварин. В першій групі – контрольні тварини, в другій – щури, які підлягали впливу телегаматерапії за інтенсивно-концентрованою методикою. Променеву терапію проводили безпосередньо на карциному Герена на апараті „АГАТ-Р” на 9 та 10 добу після перевивки пухлини. Разова доза становила 9,5 Гр, сумарна еквівалентна – 44 Гр. Поле опромінення на пухлину - 5×4 см, глибина - 1,5-2 см, тривалість - 6 хвилин 54 секунди. На 12, 16, 20 та 28 добу росту пухлини тварин виводили з експерименту під ефірним наркозом. Для гістологічного дослідження шматочки пухлини фіксували в 10% нейтральному формаліні з наступною заливкою в парафін. Отримані зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином, по Ван Гізону і толуїдиновим синім; досліджували в світлооптичному мікроскопі і документували за допомогою мікроскопа МБІ-11У42. Для електронномікроскопічного аналізу пухлин тварин виводили з експерименту на 12 та 28 добу після перевивки пухлини. Шматочки пухлин фіксували в 2,5% розчині глютаральдегіду, постфіксували 1% розчином тетраоксиду осмію на фосфатному буфері. Подальша обробка проводилась згідно загальноприйнятої методики. Ультра-

тонкі зрізи, виготовлені на ультрамікромомі LKB-III, контрастували ураніл ацетатом, цитратом свинцю згідно методу Рейнольда та вивчали в електронному мікроскопі EM-125к. Морфометричне дослідження проводили за допомогою аналізатора зображень: мікроскопа Люмам P8 з цифровою камерою Kokom CCD та персонального комп'ютера. Вимірювались метричні характеристики ангіогенезу на базі програмного забезпечення UTHSCSA Image Tool ® for Windows ® (version 2.00). В ролі залежних змінних виступали такі показники: середня площа судини - P1, щільність судин (кількість мікросудин на одиницю площі пухлини) – P2 та відношення площі судин до площі пухлини – P3. Для статистичного аналізу було використано багатомірні процедури генералізованих лінійних моделей надпараметризованого класу GLM пакету системи SAS version 9.1.3.

#### **Результати**

При мікроскопічному дослідженні препаратів експериментальної пухлини під впливом променевої терапії за інтенсивною методикою, в порівнянні з контролем, через 12, 16, 20 і 28 діб визначається певна динаміка змін судинного русла разом із стромально-паренхіматозним компонентом.

Через 12 діб гістоструктура пухлини під впливом опромінення характеризується початковими дистрофічними змінами пухлинних клітин: перинуклеарна та інтрануклеарна вакуолізація, зернистість або розрідженість цитоплазми. Поміж цих клітин помітні макрофаги, нейтрофільні лейкоцити, ланцюжки фібробластів та ангіобластичні бруньки. Волокнисті структури, фібробласти і фіброцити переважають в капсулі, яка здебільшого багата судинами різного калібру. Під капсулою на периферії пухлини шар поліморфних багатоядерних пухлинних клітин з базофільною та еозинофільною цитоплазмою, часто з гіпертрофованими багатоядерцевими і поліплоїдними ядрами. Далі ближче до середини пухлинного поля лежить вузька смужка еозинофільного клітинного детриту, біля якого розміщений і явний детрит, насичений нейтрофілами з гематоксиліновими тільцями. Зустрічається багато зруйнованих деградуючих клітин, що мають лише слабкі контури гомогенізованої цитоплазми і крихітки колишнього ядра. Тут безліч так званих дистрофізованих "уніфікованих" клітин, що нагадують гіпертрофовані епітеліоїдні клітини. Частіше вони мають неправильну форму, гомогенну неструктуровану цитоплазму, овальне або трикутне ядро каламутно-синього забарвлення з ледь помітним малюнком хроматина. Капілярів виявляється мало і найчастіше вони розширені. В стінках судин подекуди відмічається нейтрофільна інфільтрація. Мікросудини зустрічаються здебільшого із частково гомогенізованими стінками, окремі з них з елементами крові (рис.1). Електронномікроскопічно також підтверджується значний спад активності та руйнування гіалоплазми і органел пухлинних клітин. Відсутня клітинна мембрана в

місцях контактів між пухлинними клітинами, що веде до їх руйнування; клітинні елементи розташовуються в міжклітинному просторі, ядрце фрагментоване. В збережених клітинах відбувається розподіл гетерохроматину по всьому ядру.

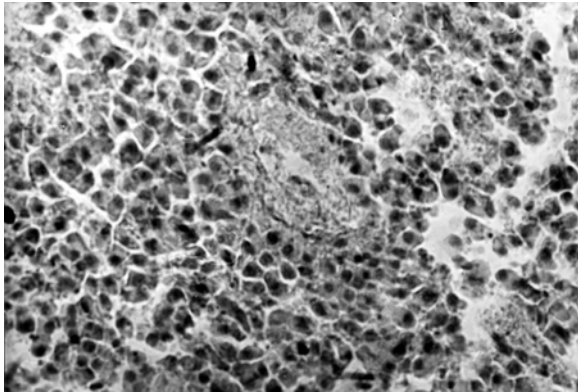


Рис. 1. Розширена капілярна судина із гомогенованою стінкою. Опромінення, 12 діб, гематоксилін-еозин,  $\times 400$ .

Гістоморфометричним аналізом мікропрепаратів пухлин шурів, які зазнали впливу променевої терапії, встановлено, що кількість судин на  $1 \text{ мм}^2$  гістопрепарату на 12-ту добу становить  $104 \pm 19$  та  $115 \pm 21$  в центрі та на периферії пухлини відповідно (в контролі –  $140 \pm 19$  і  $165 \pm 18$ ). Середня площа судини –  $569,76 \pm 98,47 \text{ мкм}^2$  в центральній та  $532,02 \pm 106,53 \text{ мкм}^2$  в периферичній зонах пухлини. В тварин контрольної групи ці показники становлять:  $475,78 \pm 28,35$  і  $450,25 \pm 31,61 \text{ мкм}^2$ . Відношення площі судин до площі пухлини в опроміненіх пухлинах склало  $0,058 \pm 0,009$  в центрі та  $0,06 \pm 0,011$  на периферії пухлини; в контролі –  $0,066 \pm 0,008$  і  $0,074 \pm 0,007$  відповідно.

На 16 добу на периферії пухлинного трансплантату шурів, які зазнали опромінення, помітно певний наступ сполучнотканинної капсули на поле пухлини. Капсула відносно ущільнена, містить мікросудини, які не зазнають перекалібровки. В місцях заміщення паренхіми пухлини сполучною тканиною можна знайти судини, переважно капілярного типу. Помітні місця ангіобластичного росту, визначаються і сполучнотканинні смуги, як наслідок фібробластичної активації, які спрямовані всередину пухлинного поля. Пухлинні клітини на цей час дуже поліморфні та трансформовані, часто велетенські з поліплоїдним ядром. Скрізь чимала кількість некротизованих не-областомних клітин, шляхом каріорексису. Центральні ділянки пухлини краще консолідовані, щільніше сусідують поліморфні клітини із спотвореними ядрами, тут більш значний фібробластичний процес. Нейтрофільна і лімфоцитарна інфільтрація виглядає слабшою. Судини виявляються рідше, вони щілиноподібного типу, стінка їх має структуру стінки соматичного капіляра.

Підраховано, що щільність судин на 16-ту добу в опроміненіх тварин дорівнює  $77 \pm 16$  судин

на  $1 \text{ мм}^2$  гістопрепарату в центрі та  $86 \pm 19$  - на периферії пухлини, а в контрольних тварин –  $88 \pm 11$  і  $110 \pm 19$  відповідно. Середня площа судини під впливом опромінення  $723,01 \pm 143,88 \text{ мкм}^2$  в центральній та  $669,52 \pm 94,52 \text{ мкм}^2$  на периферичній частині пухлини (в інтактних тварин –  $627,98 \pm 199,32$  і  $563,84 \pm 208,23 \text{ мкм}^2$  відповідно). В тварин першої групи відношення площі судин до площі пухлини становить  $0,054 \pm 0,013$  в центральній і  $0,06 \pm 0,015$  на периферичній частині пухлини; в тварин другої –  $0,055 \pm 0,012$  (центр) та  $0,057 \pm 0,012$  (периферія).

По 20-й добі з моменту перевивки пухлини після проведеної телегаматерапії за інтенсивною програмою гістологічна структура пухлини на периферії мозаїчна. В багатьох місцях пухлина ще ніби й структурована, проте самі клітини значно дистрофізовані, а поміж клітинами і на їх оболонках виявляються лімфоцити. В пухлині відносно багато не однакових за площею осередків некрозу, оточених дегенеративно зміненими пухлинними клітинами і насичених детритом нейтрофільних лейкоцитів. Частіше зустрічаються порожні судини капілярного калібру. Подекуди виявляються розеткоподібні структури, в центрі яких розміщена веноулярна судина з дегенеруючими клітинами пухлини навколо. Серед цих клітин часто є такі, що мають піняву цитоплазму і залишки ядра або без'ядерні. Скоріш за все, вони є гіпертрофованими макрофагами з фагоцитованими дрібними жировими краплинами. Зустрічаються абортивні мітози і ніби "кипіння" ядра, що нагадує апоптозні тільця. В центрі пухлини також є некротичні поля, але їх менше і вони поступаються за площею тим, що на периферії. Вони часто біля розширеної і повнокровної судини межують із вкрай дистрофізованими пухлинними клітинами, серед яких зустрічаються одиниці велетенських розмірів. Також в ділянках більш-менш стабільної комплексності можна спостерігати "піняві" макрофаги, для яких характерна "багатоядерність", яка обумовлена, мабуть, фагосомами з фрагментами пухлинних клітин, що розпадаються, в тому числі шляхом апоптозу. Судинний компонент в центрі пухлини багатший, представлений галуженнями капілярів і розширеними судинами з форменими елементами крові.

Було підраховано, що на 20-ту добу після перевивки відношення площі судин до площі пухлини в центрі склало: в опроміненіх шурів  $0,048 \pm 0,007$ , на відміну від  $0,0430 \pm 0,011$  в контрольних, на периферії пухлини –  $0,05 \pm 0,01$  та  $0,05 \pm 0,015$  в тварин дослідної та контрольної груп відповідно. Кількість судин на  $1 \text{ мм}^2$  гістопрепарату становить: в дослідній групі -  $47 \pm 12$  в центральній та  $53 \pm 13$  на периферичній частині пухлини; в контрольній групі –  $56 \pm 10$  і  $71 \pm 14$  на  $1 \text{ мм}^2$  гістопрепарату. Середня площа однієї судини в пухлинах під впливом опромінення дорівнює  $1052,02 \pm 223,19 \text{ мкм}^2$  (центр) та  $964,94 \pm 155,14 \text{ мкм}^2$  (периферія пухлини) на відміну від  $802,5 \pm 263,02 \text{ мкм}^2$  і  $717,07 \pm 222,69 \text{ мкм}^2$  в пухлинах інтактних тварин.

Через 28 днів після трансплантації пухлини в гістологічних препаратах з периферійних частин пухлини визначаються дегенеративні зміни, найглибшими з яких є некротичні із безумовною втратою судинного русла. Відбувається вrostання в паренхіму з боку капсули. Пухлинні клітини поряд з ліпоцитами розташовані рідко, оптично темні, з великим одним або двома гіперхромними ядрами. Поміж острівцями дегенеруючих клітинних сімейств зустрічаються зони абсолютного некрозу, досить великі за площею. Пухлинні клітини знаходяться в стані глибокої гідропічної дистрофії й некробіозу, стрімко втрачають комплексність. Зустрічаються без'ядерні і ядерні великі "пінняві" макрофаги, в яких помітно послабилася фагоцитарна активність. Серед відносно збережених популяцій бластомних клітин вже немає дуже спотворених велетенських.

Субмікроскопічно на цей термін дослідження, окрім некрозу пухлинних клітин, виявляється і припинення їх існування шляхом апоптозу. Спостерігається початок апоптозної загибелі пухлинної клітини: внутрішньоклітинний набряк, значно розширені цистерни ендоплазматичної сітки, з'являються осміофільні глибки, ядерце дифундувало все ядро.

Щодо судинного забезпечення пухлинної паренхіми, то поряд із капсулою на фоні фібрилогенезу виявляються окремі новоутворені судинні щілини, а в місцях розріджених структур пухлини - поодинокі порожні капіляри без ознак функціонування. Виявляється набряк ядер ендотеліоцитів (Рис.2). Помітні темні смужки капілярів, що спалися, як наслідок їх запустіння, і ділянки розширених спорожнелих капілярів, що мають варикозний вигляд.

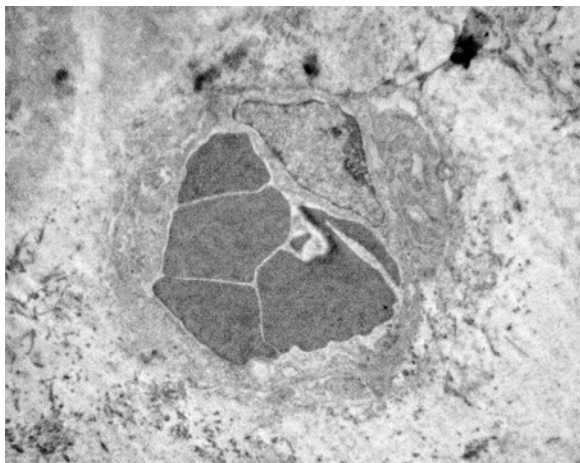


Рис. 2. Сладж в судині з некротизованими гомогенізованими стінками і набряклим ядром ендотеліоцита. Опромінення, 28 днів. Електроннограма,  $\times 15000$ .

При гістоморфометричному дослідженні на 28-му добу обраховано, що середня площа судини в пухлинах щурів, які зазнали опромінення, становить  $1428,19 \pm 266,51$  мкм<sup>2</sup> в центральній та

$1290,79 \pm 309,17$  мкм<sup>2</sup> на периферичній частині пухлини, в пухлинах щурів контрольної групи –  $3181,29 \pm 1404,47$  мкм<sup>2</sup> та  $3122,43 \pm 1138,12$  мкм<sup>2</sup> відповідно. Відношення площі судин до площі пухлини: в другій групі -  $0,039 \pm 0,007$  в центрі та  $0,041 \pm 0,007$  на периферії пухлини, в першій – відповідно  $0,121 \pm 0,036$  і  $0,164 \pm 0,062$ . Щільність судин на цей термін дослідження при застосуванні променевої терапії дорівнює  $28 \pm 8$  (центр) та  $33 \pm 9$  (периферія пухлини) судин на 1 мм<sup>2</sup> гістопрепарату; в контролі –  $43 \pm 16$  і  $55 \pm 18$  відповідно.

### Обговорення

Виявлені мікроскопічні та електронномікроскопічні зміни в експериментальній пухлині Герена у щурів після проведеної телегаматерапії за інтенсивною програмою підтверджують її дегенеративний вплив на паренхіму та судинне русло пухлини. Так, одним з основних механізмів редукції судинного русла пухлини за умов дії опромінення є гомогенізація некротизованих стінок судин та гемостаз в них за типом сладжу еритроцитів.

Аналізуючи кількісні гістоморфометричні характеристики судинного русла пухлин, слід відмітити, що проводилось одночасне дослідження кількох залежних змінних, а саме P1, P2 і P3. Таке ж одночасне тестування ефектів, пов'язаних з кількома залежними змінними, входить в площину тестування багатомірних гіпотез (наприклад, середні значення P1, P2 і P3 значно різняться на різних комбінаціях градацій незалежних змінних). Згідно загального збалансованого дизайну дослідження вивченню підлягали такі ефекти: "Case"- вплив (опромінення-контроль); "Time" - час; "Perif" - локалізація (периферична/центральна); "Case\*Time"- ефект взаємодії змінних впливу і часу; "Case\*Time\*Perif"- ефект взаємодії змінних впливу, часу і локалізації. Всього оцінці підлягало 45 ефектів, які вивчались в розрізі окремих градацій чинників і усіх їх можливих комбінацій. Зміни показників P1, P2 і P3 оцінювались за умови контролю інших змішуючих ефектів.

Так в табл.1 наведені результати багатомірного аналізу ефектів у об'єднаній групі опромінення-контроль (R - коефіцієнт множинної кореляції моделі, R<sup>2</sup> - коефіцієнт детермінації). Як свідчать представлені коефіцієнти детермінації, незалежні змінні і їх комбінації пояснюють 75,2%, 44,2%, і 63,7% варіації показників P1, P2, P3 відповідно. Усі коефіцієнти суттєві (p<0,01) і вказують на досить потужну інформаційну обумовленість моделі. Шляхом тестування багатомірних гіпотез проаналізовано, які саме незалежні змінні і їх комбінації найбільше визначають рівні показників P1, P2, P3 разом. З результатів аналізу (табл.2) видно, що всі основні ефекти (вплив, час, локалізація), ефекти другого порядку (поєднання двох змінних) і ефекти третього порядку (поєднання трьох змінних) є суттєвими з p<0,01.

## Дослідження загальної інформативності моделі

	R	R <sup>2</sup>	Сума квадратів моделі	Ступені свободи моделі	Середній квадрат моделі	Сума квадратів помилки	Ступені свободи помилки	Середній квадрат помилки	F	p
P1	0.867	0.752	331907517	15	22127168	109117730	464	235167.5	94.1	0.00
P2	0.665	0.442	777324	15	51822	978277	464	2108.4	24.6	0.00
P3	0.798	0.637	0	15	0	0	464	0.0	54.4	0.00

Таблиця 2

Багатомірне тестування вірогідності ефектів надпараметризованої моделі збалансованого плану за типом III декомпозиції ( $\Lambda$  - значення лямбди Уїлкса, F – критерій Фішера)

Ефекти	$\Lambda$	F	Ступені свободи ефекту	Ступені свободи помилки	P
Середнє	0.074830	1904.011	3	462.000	0.000000
Case	0.680108	72.435	3	462.000	0.000000
Time	0.227656	104.571	9	1124.537	0.000000
Perif	0.923415	12.772	3	462.000	0.000000
Case*Time	0.472739	45.043	9	1124.537	0.000000
Case*Perif	0.973399	4.209	3	462.000	0.005936
Time*Perif	0.941733	3.120	9	1124.537	0.001020
Case*Time*Perif	0.952644	2.516	9	1124.537	0.007460

Для того, щоб оцінити достовірність ефектів по окремим залежним змінним (показникам P1-P3), проводилось тестування одномірних лінійних гіпотез ефектів. Результати тестування наведені в табл.3. Так, середня площа судини (показник P1) в пухлинах опромінених тварин суттєво обумовлюється ефектами вплив, час, і їх взаємодією з  $p < 0,001$ . Вона відмінна у тварин дослідної групи в порівнянні з тваринами контрольної групи ( $p < 0,001$ ). Значення середньої площі однієї суди-

ни в пухлинах достовірно збільшуються ( $p < 0,001$ ) з ростом пухлини, тобто з 12 до 28 доби. Достовірна відмінність показника P1 у пухлинах тварин, які підлягали впливу променевої терапії, в порівнянні з пухлинами тварин контрольної групи відмічається, також, в часі ( $p < 0,001$ ). Так, на 28 добу середня площа судини у пухлинах тварин, які зазнали опромінення, менша ніж в пухлинах інтактних тварин ( $p < 0,001$ ).

Таблиця 3

Результати тестування одномірних лінійних гіпотез ефектів у розрізі показників ангіогенезу

Ефекти	Df	P1 Сума квадратів	P1 Середня сума квадратів	P1 F	P1 p	P2 Сума квадратів	P2 Середня сума квадратів	P2 F	P2 p
Середнє	1	552855117	552855117	2350.9	0.000000	3194640	3194640	1515.3	0.000000
Case	1	13779064	13779064	58.593	0.000000	86968	86968	41.249	0.000000
Time	3	232446788	77482263	329.477	0.000000	611274	203758	96.643	0.000000
Perif	1	566524	566524	2.409	0.121320	35243	35243	16.716	0.000051
Case*Time	3	84987530	28329177	120.464	0.000000	16641	5547	2.631	0.049548
Case*Perif	1	12536	12536	0.053	0.817510	11165	11165	5.296	0.021821
Time*Perif	3	79358	26453	0.112	0.952790	9280	3093	1.467	0.222754
Case*Time*Perif	3	35717	11906	0.051	0.984936	6753	2251	1.068	0.362472
Помилка	464	109117730	235168			978277	2108		
Всього	479	441025246				1755601			

Ефекти	P3 Сума квадратів	P3 Середня сума квадратів	P3 F	P3 p
Середнє	2.061534	2.061534	3627.1	0.000000
Case	0.102168	0.102168	179.758	0.000000
Time	0.116813	0.038938	68.508	0.000000
Perif	0.007466	0.007466	13.137	0.000322
Case*Time	0.215695	0.071898	126.501	0.000000
Case*Perif	0.004101	0.004101	7.216	0.007484
Time*Perif	0.008753	0.002918	5.133	0.001680
Case*Time*Perif	0.008868	0.002956	5.201	0.001532
Помилка	0.263720	0.000568		
Всього	0.727584			

Також з табл. 3 видно, що щільність судин (P2) суттєво обумовлюється ефектами вплив, час, локалізація з  $p < 0,001$  і взаємодіями вплив\*час, вплив\*локалізація з  $p < 0,05$ . Цей показник відмінний в пухлинах тварин, які підлягали впливу променевої терапії, від пухлин інтактних тварин контролем, тобто P2 приймає суттєво нижчі значення в пухлинах тварин, які отримували опромінення ( $p < 0,001$ ). Кількість судин на  $1 \text{ mm}^2$  гісто-препарату достовірно зменшується з 12 до 28 доби ( $p < 0,001$ ). Відмічається також і суттєва відмінність щільності судин у пухлинах дослідних тварин, в порівнянні з пухлинами інтактних тварин, в часі - показник P2 менший під впливом опромінення ніж в контролі на всі терміни дослідження ( $p < 0,05$ ). Щільність судин також достовірно більша при локалізації на периферії, аніж в центрі пухлини ( $p < 0,001$ ). Така відмінність зберігається і наростає в пухлинах опромінених щурів на відміну від нелікованих тварин ( $p < 0,05$ ).

Відношення площі судин до площі пухлини (P3) суттєво обумовлюється всіма головними ефектами, ефектами другого та третього порядку з  $p < 0,01$  (табл.3). Показник P3 обрахований в пухлинах щурів дослідної групи достовірно нижчий, ніж в пухлинах інтактних щурів ( $p < 0,001$ ). В опромінених пухлинних трансплантатах відбувається поступове зменшення відношення площі судин до площі пухлини під час росту пухлин в часі (з 12 до 28 доби) в порівнянні з пухлинами нелікованих тварин, де показник зменшується з 12 до 20 доби, а потім на 28 добу різко збільшується ( $p < 0,001$ ). Суттєво нижчі значення P3 відмічаються в центральних, на відміну від периферич-

них, ділянках пухлин ( $p < 0,001$ ). Ця відмінність зберігається і наростає в пухлинах опромінених щурів на відміну від нелікованих тварин ( $p < 0,01$ ). Показник P3 також достовірно з  $p < 0,01$  знижується в динаміці (в часі) та локалізації одночасно. В карциномах опромінених тварин відношення площі судин до площі пухлини достовірно знижується одночасно в часі (з 12 до 28 доби) і по локалізації пухлини (в центрі – менше, на периферії – більше значення P3), в порівнянні з контролем ( $p < 0,01$ ).

#### Висновки

1. При використанні променевої терапії за інтенсивною методикою у щурів з експериментальною пухлиною Герена морфологічно виявляються дегенеративні зміни в паренхімі пухлини та її судинному руслі.

2. Ріст середньої площі судини в пухлинах тварин, які зазнали променевого впливу, менший, ніж в пухлинах інтактних тварин. В опромінених пухлинних трансплантатах, на відміну від карцином без будь-якого впливу, спостерігається зменшення щільності судин та відношення площі судин до площі пухлини в процесі їх росту.

3. На підставі визначених змін основних показників пухлинного ангиогенезу під впливом променевої терапії можна припустити певну реалізацію її антиангіогенної дії.

**Перспективами подальших досліджень** в даному напрямку є вивчення якісних та кількісних характеристик мікроциркуляторного русла в експериментальній пухлині Герена під впливом цитостатика циклофосфаміду та імуномодулятора тималіну в різні періоди пухлинної прогресії.

#### Літературні джерела

Новак О.Є., Лісняк І.О., Чехун В.Ф. Ангіогенез у розвитку злоякісних пухлин: теоретичні і практичні аспекти // Онкологія.- 2002.- Т.4, №4.- С.244-251.

Соляник Г.И. Противоопухолевая антиангиогенная терапия: принципы, проблемы, перспективы // Онкология.- 2006.- Т.8, №2.- С.206-208.

Фільченков О.О., Стойка Р.С. Апоптоз і рак: від теорії до практики.- Тернопіль: ТДМУ, 2006.- 524 с.

Angiogenesis in vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) and in vulvar cancer / Bancher-Todesca D., Obermair A., Bilgi S. et al. // Eur. J. Gynecol. On-

col.- 1997.- Vol.18.- P.224-232.

Angiogenesis as a prognostic indicator in cervical intraepithelial neoplasia / Dobbs S., Johnson I., Hewett P., Murray J. // Eur. J. Gynecol. Oncol.- 1997.- Vol.18.- P.220-229.

Salvesen H., Iversen O., Akslen L. Prognostic significance of angiogenesis and Ki-67, p53 and p21 expression: a population based endometrial carcinoma study // J. Clin. Oncol.- 1999.- Vol.17.- P.1382-1390.

Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis // Semin. Oncol.- 2002.- Vol.29, №6.- P.15-18.

**Лысенко С.А. Качественная и количественная характеристика ангиогенеза в облученных опухолевых трансплантатах у крыс.**

**Резюме.** Представлены качественные и количественные результаты морфологического исследования ангиогенеза экспериментальной опухоли Герена под влиянием лучевой терапии по интенсивной методике. Произведен микроскопический и морфометрический анализ сосудов микроциркуляторного русла в интактных и облученных опухолевых трансплантатах у 80 беспородных крыс обеих полов. Для статистической обработки использованы многомерные процедуры генерализованных линейных моделей системы SAS. С помощью световой и электронной микроскопии выявлено общую дегенерацию паренхимы

и сосудистого русла опухолей, а также признаки ингибирующего эффекта облучения на рост сосудов. При гистоморфометрическом определении показателей ангиогенеза установлено, что в опухолях животных, которые подвергались влиянию телегаматерапии, достоверно уменьшается количество сосудов на единицу площади, а также соотношение площади сосудов до площади опухоли и существенно увеличивается средняя площадь одного сосуда по сравнению с опухолями животных контрольной группы. Такие изменения происходят в динамике, а именно с ростом экспериментальных опухолей с 12 по 28 сутки после их перевивки. Это свидетельствует о том, что лучевая терапия, возможно, имеет антиангиогенное влияние.

**Ключевые слова:** опухолевый ангиогенез, облучение, деградация, гистоморфометрия, многомерный анализ, количество сосудов на единицу площади.