

## Оригінальні статті

УДК 616.831–006.484:612.6:612.015

### Исследование пролиферативного потенциала глиом человека в краткосрочной культуре для определения чувствительности к антибластическим химиопрепаратам

*Васильева И.Г., Розуменко В.Д., Главацкий А.Я., Олексенко Н.П., Галанта Е.С., Чопик Н.Г., Цюбко О.И., Вашуленко Т.Н.*

**Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев, Украина**

Изучена интенсивность включения  $H^3$ -тимидина в краткосрочных культурах, полученных из 20 образцов биопсийного материала глиом головного мозга человека. Установлено, что во всех гистологических группах, независимо от степени злокачественности опухоли, есть опухоли, в которых интенсивность включения нуклеотида не отличалась от фоновой. В других образцах этот показатель значительно различался внутри гистологической группы. Обсуждены условия, при которых изменения радиоактивности адекватно отражают индивидуальную чувствительность клеток опухоли к химиопрепаратам.

**Ключевые слова:** глиомы человека, включение  $H^3$ -тимидина, пролиферативный потенциал.

Оценка пролиферативного потенциала опухолей является важным прогностическим критерием, который следует учитывать при назначении химиотерапии. Существует большое число методов определения пролиферативной активности клеток. Классическим методом является прямой подсчет количества митозов в гистологическом препарате. Он позволяет выявить только клетки, находящиеся в фазе конденсации и расхождения хромосом, когда видны характерные фигуры митоза. Позже появились методы, в которых применяли радиоактивно или флуоресцентно меченые нуклеотиды —  $H^3$ -тимидин и бромдезоксигуанидин, что дало возможность выявлять клетки, находящиеся в фазе удвоения ДНК, предшествовавшей митотическому делению. В последнее время для изучения пролиферативной активности используют иммуногистохимические методы визуализации ядерных антигенов — MIB-1, Ki-67, PCNA, что позволяет выявлять более широкий спектр клеток опухоли, способных к делению [5, 10].

Каждый метод имеет преимущества и недостатки, что определяет спектр его применения. Использование метода включения  $H^3$ -тимидина в клетки опухоли дает возможность исследовать большое количество материала путем измерения суммарной включенной радиоактивности. Это позволяет оценить пролиферативную активность значительно большего числа клеток, чем при подсчете их в поле зрения микроскопа, использовании метода гисторадиоавтографии, а

также методов, предполагающих визуализацию продуктов реакции, что сводит к минимуму фактор участия человека. Кроме того, при измерении включенной радиоактивности нуклеотидов отсутствуют артефакты, связанные с визуализацией продуктов реакции, а неспецифическое связывание аннулируется при вычитании фоновых значений. Однако этот метод позволяет получить достоверные результаты только для популяций клеток, находящихся в фазе логарифмического роста, то есть содержащих большое количество интенсивно делящихся клеток.

Изменение уровня включенной радиоактивности под влиянием тех или иных воздействий свидетельствует об угнетении или повышении пролиферативной активности клеток опухоли. Метод часто используют для изучения динамики популяций клеток в культуре и тестирования новых препаратов на штаммах клеток опухоли, поскольку многие препараты — ингибиторы деления, например, токсичные аналоги нуклеотидов — оказывают свое действие именно в S-фазе клеточного цикла [3].

Несмотря на большое число работ и широкий спектр методов, применяемых для оценки пролиферативного потенциала опухолей, оценка результатов, особенно полученных на клиническом материале, часто неоднозначна. Многие авторы отмечают несоответствие между теоретическим и реальным временем удвоения популяции клеток опухоли [6, 11]. Реальное время удвоения популяции клеток глиом при

отсутствии их гибели составляет от 2 сут до 1 мес и более [6]. При этом длительность цикла одной клетки опухоли составляет в среднем 1–2 дня [7, 11].

Разница между длительностью цикла каждой клетки и временем удвоения популяции клеток обусловлена наличием неделящихся клеток. Глиомы человека содержат различное количество активно пролиферирующих и непролиферирующих клеток. По данным литературы, только 5–15% клеток этих опухолей находятся в состоянии деления, их называют стволовыми клетками [7], остальные 85–95% клеток не делятся, их называют “рестинг”, или покоящимися клетками. Даже в глиобластомах фракция непролиферирующих клеток составляет 60–70% [8].

Кроме того, величина фракции активно пролиферирующих клеток в глиомах также может варьировать. Опухоль растет не равномерно, а периодами, во время пролиферативной фазы, которая сменяется стационарной. Фазность роста наблюдают как на тканевом, так и клеточном уровне. При использовании гисторадиоавтографического метода на первичных культурах глиом установлено, что меченый тимидин обнаруживают преимущественно в клетках опухоли с крупными ядрами и большим объемом цитоплазмы [1]. Это является экспериментальным подтверждением того, что периоду синтеза ДНК предшествует интенсивный рост клетки в фазе G<sub>0</sub>. Достижение определенной “критической массы” является условием синтеза ДНК. Возможно, переход из одной фазы в другую и сопровождается изменением фракции делящихся клеток [1].

Об этом свидетельствуют также данные о широкой вариабельности индекса мечения в гистологически идентичных вариантах астроцитом. Даже в астроцитомах с низкой степенью злокачественности он может составлять от менее чем 1 до 9,3% [9]. Таким образом, объем фракции клеток опухоли, находящихся в S-фазе клеточного цикла, может различаться в глиомах примерно в 10 раз. По данным других авторов, в глиобластомах объем фракции активно делящихся клеток составляет от 7,3 до 30% [7].

Такие различия пролиферативного потенциала затрудняют применение этого показателя при оценке чувствительности глиом к химиопрепаратам в клинике, поскольку в пределах одной и той же степени злокачественности существуют опухоли как с большим, так и малым количеством делящихся клеток. Считаем, что для исследования изменений пролиферативной активности тех и других необходимо использовать разные

методы оценки. При наличии глиом с низким пролиферативным потенциалом необходимо проводить гистохимическую визуализацию ядерных антигенов и определять индекс гистохимического мечения клеток опухоли; глиом с большим количеством делящихся клеток — применять методы включения меченых нуклеотидов — H<sup>3</sup>-тимидина и бромдезоксигуанидина. По данным литературы, меченый тимидин способен включать в культуру 20–30% глиом [11].

Задачей работы явилось исследование интенсивности включения H<sup>3</sup>-тимидина в клетки глиом человека *in vitro* для оценки информативности метода в прогнозировании эффективности химиотерапии у нейроонкологических больных.

**Материалы и методы исследования.** Ткань удаленной во время операции опухоли до начала исследований помещали в пенициллиновый флакон со средой Игла при температуре 37°C. Для получения суспензии клеток глиомы головного мозга человека из материала вырезали относительно однородные участки массой 50–100 мг и суспендировали в 1 мл питательной среды. В пробу вносили 50 мкл суспензии. При этом количество клеток составляло от 0,5 до 7 млн. в 1 мл (в зависимости от того, насколько ткань опухоли подвергается суспендированию с помощью мягкой пипетки). Наиболее часто получали суспензию, содержащую 1–2 млн. клеток в 1 мл.

Клетки опухоли, в соответствии с методикой, предложенной Р. Фрешни и соавторами [3], культивировали при температуре 37°C в течение 4 ч в среде Игла, содержащей H<sup>3</sup>-тимидин с активностью 75 мк Ci/мл в присутствии химиопрепаратов: 19 мкг/мл карбоплатина, 107 мкг/мл флуороурацила, 16 мкг/мл ломустина. При расчете концентрации препарата для тестов *in vitro* учитывали его допустимый уровень в крови при назначении в клинике [3].

Интенсивность включения H<sup>3</sup>-тимидина определяли с помощью сцинтилляционного счетчика “Бета-1” (“Медаппаратура”, 1983).

Гистоструктуру и степень злокачественности глиом оценивали в соответствии с принятой в Институте классификацией опухолей центральной нервной системы, разработанной Ю.А. Зозулей и соавторами [2].

Количество клеток в контрольных и опытных образцах подсчитывали с помощью светового микроскопа и камеры Горяева [4]. 50 мкл суспензии клеток разводили в 5 раз 0,2% раствором трипанового синего и ставили в термостат на 3–5 мин при температуре 37°C. Суспензию тщательно перемешивали и вводили

в камеру гемоцитометра. Под микроскопом подсчитывали количество клеток, содержащих трипановый синий.

**Результаты и их обсуждение.** Изучена интенсивность включения  $H^3$ -тимидина в суспензию биопсийного материала опухолей головного мозга 20 больных для выявления тех из них, которые активно включали меченый нуклеотид. В большинстве образцов интенсивность включения невысока (до 200–300 имп./мин в 1 мг ткани или в 1 млн клеток суспензии). Мы считали такие опухоли как находящиеся в стационарной фазе роста (см. таблицу). В 6 наблюдениях отмечена высокая интенсивность включения метки (от 1500 до 12000 имп./мин).

Характерно, что в гистологически однородных группах опухолей интенсивность включения  $H^3$ -тимидина варьировала в широких пределах.

Так, в группе фибриллярно-протоплазматических астроцитом II степени злокачественности интенсивность включения  $H^3$ -тимидина изменялась от 100 до 1500 имп./мин, достигая в отдельных наблюдениях 7000–9000 имп./мин. В группе анапластических астроцитом III степени злокачественности этот показатель составил от 90 до 1500 имп./мин, в одном наблюдении — 12000 имп./мин. В глиобластах интенсивность включения меченого тимидина составляла от 350 до 1100 имп./мин. По данным гисторадиографии индекс мечения тимидином для астроцитом низкой степени злокачественности также значительно различался и составлял 3–14%, в атипичных астроцитомах — 10–16% [2].

Если интенсивность включения меченого нуклеотида глиомами человека условно разделить на 4 уровня: низкий (до 100 имп./мин), средний

#### Оценка индивидуальной чувствительности к химиопрепаратам глиом человека в краткосрочной суспензионной культуре ( $M \pm m$ )

| Контроль  |                              | Флюороурацил              |            |                              | Карбоплатин               |            |                              | Ломустин                  |            |                              |
|---|------------------------------|---------------------------|------------|------------------------------|---------------------------|------------|------------------------------|---------------------------|------------|------------------------------|
| имп./мин на 1 млн. клеток                             | количество мертвых клеток, % | имп./мин на 1 млн. клеток | % снижения | количество мертвых клеток, % | имп./мин на 1 млн. клеток | % снижения | количество мертвых клеток, % | имп./мин на 1 млн. клеток | % снижения | количество мертвых клеток, % |
| <b>Глиобластомы</b>                                   |                              |                           |            |                              |                           |            |                              |                           |            |                              |
| 1108±207  | 30                           | 1088±218                  | 2          | 35                           | 867±113                   | 22         | 48                           | 1612±403                  | 0          | 36                           |
| 727±158   | 38                           | 204±41*                   | 72         | 40                           | 191±40*                   | 74         | 40                           | 765±114                   | 0          | 54                           |
| 658±162   | 31                           | 510±125                   | 22         | 33                           | 230±57*                   | 65         | 49                           | 390±96                    | 41         | 34                           |
| 397±30  | 35                           | 467±61                    | 0          | 47                           | 412±54                    | 0          | 45                           | 302±24                    | 24         | 52                           |
| 358±108   | 38                           | 2096±3                    | 42         | 40                           | 224±67                    | 37         | 40                           | 453±127                   | 0          | 43                           |
| <b>Астроцитомы анапластические III</b>                |                              |                           |            |                              |                           |            |                              |                           |            |                              |
| <b>12177±191</b>                                      | <b>35</b>                    | <b>484±73**</b>           | <b>96</b>  | <b>55</b>                    | <b>487±65**</b>           | <b>96</b>  | <b>62</b>                    | <b>471±52**</b>           | <b>96</b>  | <b>57</b>                    |
| 1458±277  | 20                           | 1146±217                  | 21         | 16                           | 317±65*                   | 78         | 29                           | 118±26*                   | 92         | 18                           |
| 338±46  | 33                           | 396±51                    | 0          | 40                           | 294±38                    | 13         | 35                           | 518±67                    | 0          | 34                           |
| 271±26  | 24                           | 346±69                    | 0          | 24                           | 187±24                    | 31         | 27                           | 185±28                    | 32         | 40                           |
| 93±8  | 17                           | 77±6                      | 18         | 17                           | 114±29                    | 0          | 18                           | 88±22                     | 5          | 20                           |
| <b>Астроцитомы фибриллярно-протоплазматические II</b> |                              |                           |            |                              |                           |            |                              |                           |            |                              |
| <b>8991±1798</b>                                      | <b>25</b>                    | <b>2191±482*</b>          | <b>76</b>  | <b>25</b>                    | <b>3910±586*</b>          | <b>56</b>  | <b>20</b>                    | <b>3567±1032</b>          | <b>60</b>  | <b>20</b>                    |
| <b>7146±1500</b>                                      | <b>15</b>                    | <b>354±44*</b>            | <b>95</b>  | <b>45</b>                    | <b>4597±919</b>           | <b>36</b>  | <b>34</b>                    | <b>1456±247*</b>          | <b>80</b>  | <b>30</b>                    |
| <b>5955±1133</b>                                      | <b>23</b>                    | <b>507±11**</b>           | <b>91</b>  | <b>63</b>                    | <b>463±29**</b>           | <b>92</b>  | <b>25</b>                    | <b>1211±582*</b>          | <b>80</b>  | <b>47</b>                    |
| 1118±142  | 24                           | 1263±189                  | 0          | 25                           | 1304±196                  | 0          | 24                           | 1122±146                  | 0          | 23                           |
| 709±22  | 30                           | 740±45                    | 0          | 30                           | 206±23*                   | 71         | 35                           | 204±18*                   | 72         | 35                           |
| 618±63  | 36                           | 728±72                    | 0          | 35                           | 766±115                   | 0          | 34                           | 353±37*                   | 43         | 33                           |
| 377±57  | 25                           | 268±32                    | 29         | 23                           | 347±38                    | 8          | 25                           | 304±55                    | 19         | 23                           |
| 100±25  | 12                           | 85±21                     | 15         | 13                           | 113±28                    | 0          | 12                           | 65±16                     | 35         | 20                           |
| <b>Олигодендроастроцитомы II</b>                      |                              |                           |            |                              |                           |            |                              |                           |            |                              |
| 457±105   | 39                           | 263±47                    | 42         | 53                           | 605±91                    | 0          | 54                           | 301±57                    | 34         | 57                           |
| 350±45  | 15                           | 458±92                    | 0          | 16                           | 454±99                    | 0          | 16                           | 412±62                    | 0          | 15                           |

(100–400 имп./мин), высокий (400–1000 имп./мин) и очень высокий (более 1000 имп./мин), окажется, что в суспензионных культурах глиобластом не было образцов с низкой радиоактивностью, преобладали средняя и высокая интенсивность включения  $H^3$ -тимидина клетками опухоли. В группе анапластических астроцитом наблюдали значительные различия этого показателя: 2 опухоли — с очень высоким уровнем включения метки, 2 — со средним, 1 — с низким. В группе фибриллярно-протоплазматических астроцитом представлены все уровни включения; в 2 олигодендроастроцитах отмечены средний и высокий уровень включения нуклеотида.

Эти данные свидетельствуют, что наибольшие изменения количества активно делящихся клеток были в группе астроцитом низкой степени злокачественности. Можно предположить, что активное включение нуклеотида в этих глиомах отражает раннее возникновение генетических изменений, обуславливающих дальнейшее озлокачествление. В то же время нельзя не учитывать фактор регионарной неоднородности в биопсийном материале.

Исследование интенсивности включения  $H^3$ -тимидина клетками краткосрочных суспензионных культур глиом человека использовано для изучения их индивидуальной чувствительности к химиотерапевтическим препаратам. Наиболее достоверные изменения интенсивности включения меченого нуклеотида отмечены в образцах опухолей с высоким пролиферативным потенциалом.

Используемый метод определения включенной радиоактивности в клетках суспензионных культур наиболее информативен с учетом количества погибших клеток. Следует предполагать, что эффективными будут препараты, которые способствуют снижению интенсивности включения радиоактивной метки, сопровождающему гибель популяции клеток. Это свидетельствует, что препарат оказывает действие на фракции как делящихся, так и покоящихся клеток. Если снижение интенсивности включения радиоактивной метки не сопровождается увеличением количества погибших клеток, можно предполагать, что препарат только временно ингибирует пролиферацию клеток опухоли. Кроме того, в некоторых наблюдениях интенсивность включения радиоактивной метки не изменялась, а количество погибших клеток значительно увеличивалось, что отражало гибель клеток опухоли, находящихся в фазе покоя. Наиболее часто такую реакцию глиом наблюдали после воздействия ломустина — алкилирующего препарата, который оказывает влияние независимо от фазы клеточного цикла.

Как показывают приведенные данные, в большинстве наблюдений глиомы, обладающие высоким пролиферативным потенциалом, реагируют на инкубацию с химиопрепаратами значительным уменьшением интенсивности включения меченого тимидина. Ингибирование пролиферации клеток опухоли может быть выражено в разной степени в зависимости от класса химиопрепарата, что отражает индивидуальную чувствительность той или иной опухоли. Значительное уменьшение суммарной включенной радиоактивности в образцах, достигающее 40–95%, коррелирует с увеличением количества погибших клеток в популяции до 60–70%, в контроле — 15–35%.

В группе глиобластом достоверное снижение интенсивности включения меченого нуклеотида отмечено в 3 наблюдениях — при применении флюороурацила и 2 — карбоплатина. В обоих образцах отмечена высокая интенсивность изначальной включенной радиоактивности. В группе анапластических астроцитом достоверное снижение интенсивности включения наблюдали также в образцах с высокой интенсивностью накопления меченого тимидина: в 1 — под действием флюороурацила, в 2 — карбоплатина, в 2 — ломустина. Аналогичная динамика отмечена и в группе фибриллярно-протоплазматических астроцитом. Достоверное снижение интенсивности включения метки выявлено в 3 наблюдениях после инкубации с флюороурацилом, в 3 — с карбоплатином, в 4 — с ломустином. Все образцы глиом, проявившие такую реакцию в суспензионных культурах, имели высокий и очень высокий уровень включения радиоактивности в контроле.

В одном из образцов олигодендроастроцитомы тенденция к снижению уровня включенной радиоактивности отмечена после инкубации с ломустином, в другом образце — выявлена резистентность по отношению ко всем препаратам.

Следует отметить также, что среди образцов глиом с очень высокой интенсивностью включения метки наблюдали более выраженную чувствительность к флюороурацилу, который относится к фармакологической группе токсических аналогов нуклеотидов. Из 5 образцов глиом, в которых обнаружено достоверное снижение интенсивности включения метки после инкубации с этим препаратом, 4 — были глиомами с очень высокой интенсивностью включения  $H^3$ -тимидина. На образцы глиом с высокой интенсивностью включения нуклеотида в клетки в суспензионных культурах большее токсичное влияние оказывают также карбоплатин, образующий сшивки ДНК с помо-

щью атомов платины, и ломустин, относящийся к фармакологической группе алкилирующих препаратов. В группах с более низкой степенью злокачественности увеличивалось число образцов, чувствительных к ломустину.

Стимуляция включения меченого предшественника нуклеотида выше контрольного уровня может отражать повышение пролиферативной активности клеток опухоли, а может быть обусловлена техническими артефактами. Так, стимуляция включения метки под действием флюороурацила является компенсаторной реакцией на подавление синтеза нуклеотидов *de novo* [3]. Повышенная внутренняя включенная радиоактивность в опытных образцах по сравнению с таковой в контроле может быть обусловлена некоторым подавлением метаболических реакций в контрольных культурах, зависящим от плотности монослоя и не проявляющимся в экспериментальных образцах, где часть клеток гибнет [3]. В большинстве исследованных образцов некоторое увеличение включенной радиоактивности выше контрольного уровня обусловлено большим среднеквадратическим отклонением. Такой разброс данных обусловлен присутствием в суспензии мелких агрегатов клеток и связыванием неспецифической радиоактивности. Достоверное повышение интенсивности включения меченого тимидина не обнаружено.

Все опухоли, резистентные к исследованным препаратам, то есть не реагирующие на их присутствие в культуральной среде снижением интенсивности включения меченого нуклеотида и увеличением количества погибших клеток, относятся к группе со средним и низким уровнем исходного включения, то есть количество пролиферирующих клеток в этих популяциях в момент исследования невелико. Однако следует отметить, что среди этих образцов в каждой гистологической группе наблюдали такие, в которых количество погибших клеток было велико без изменения интенсивности включения метки. Считаю, что исследование химиочувствительности таких образцов требует применения более чувствительных методов, например иммуногистохимических, для исключения выводов о ложной резистентности.

**Выводы.** 1. Данные, полученные при анализе изменений пролиферативного потенциала и количества погибших клеток в популяции клеток глиом человека в краткосрочной суспензионной культуре, позволяют сделать вывод о том, что при преобладании в глиомах активно делящихся и покоящихся клеток требуется разный подход при анализе их индивидуальной чувствительности к химиотерапии.

2. Исследование интенсивности включения  $H^3$ -тимидина суспензией клеток биопсийного материала глиом головного мозга дает возможность выявить опухоли, которые на момент удаления находились в фазе активной пролиферации, и изучить изменения их пролиферативного потенциала под влиянием химиопрепаратов. Благодаря измерению суммарной радиоактивности, накопленной в большом количестве клеток, этот метод наиболее точен и достоверен для оценки индивидуальной чувствительности к химиопрепаратам активно пролиферирующих глиом головного мозга.

3. При исследовании индивидуальной химиочувствительности глиом, находящихся в стационарной фазе, следует применять другие методы: оценку количества погибших клеток, иммуногистохимические методы визуализации ядерных антигенов.

### Список литературы

1. Верхоглядова Т.П., Семенова В.М. Некоторые особенности пролиферативной активности макроглиальных опухолей мозга в культуре тканей // *Вопр. нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко.* — 1982. — №5. — С.36–41.
2. Зозуля Ю.А., Верхоглядова Т.П., Шамаев М.И., Малышева Т.А. Гистобластические принципы классификации опухолей нервной системы и ее клиническое значение // *Укр. нейрохірург. журн.* — 2001. — №1. — С.32–41.
3. *Культура животных клеток. Методы* / Под ред. Р. Фрешни. — М.: Мир, 1989. — 302 с.
4. *Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы* / В.П. Божкова, П.Д. Брежестовский, В.П. Буравлев. и др. — М.: Наука, 1988. — 315 с.
5. Gordower L., Decaestecker C., Lopes M.B. et al. Determination of growth fraction and cell density to evaluate potential growth of human oligodendroglial and astrocytic tumors // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* — 1998. — V.124, N8. — P.427–434.
6. Hoshino T. Cell kinetics of glial tumors // *Rev. Neurol.* — 1992. — V.148, N6. — P.396–401.
7. Hoshino T. Prognostic implication of bromdeoxyuridine labeling index of human brain tumors // *Cell Tissue Kinet.* — 1989. — V.22, N2. — P.125.
8. Hoshino T., Wilson C.B. Review of basic concepts of cell kinetics as applied to brain tumors // *J. Neurosurg.* — 1975. — V.42, N2. — P.123–131.
9. Ito S., Chandler K.L., Prados M.D. et al. Proliferative potential and prognostic evaluation of low-grade astrocytomas // *J. Neurooncol.* — 1994. — V.19, N1. — P.1–9.
10. Kunz J., Schmidt A., Janish W. DNA synthesis activity and growth fraction of brain tumors // *Acta Histochem.* — 1992. — V.42. — P.165–170.
11. Pertuiset B., Dougherty D., Crameyer C. Stem cell studies of human malignant brain tumors. Part 2: Proliferation kinetics of brain-tumor cells in vitro in early-passage culture // *J. Neurosurg.* — 1985. — V.63, N3. — P.426–432.

**Дослідження проліферативного потенціалу  
глиом людини у короткостроковій  
культури для визначення чутливості до  
антибластичних хіміопрепаратів**

*Васильева И.Г., Розуменко В.Д., Главацкий А.Я., Олексенко Н.П., Галанта О.С., Чопик Н.Г.,  
Цюбко О.І., Вашуленко Т.М.*

Досліджено інтенсивність накопичення  $H^3$ -тимідину у короткострокових культурах, отриманих з 20 зразків біопсійного матеріалу глиом головного мозку людини. Встановлено, що в усіх гістологічних групах, незалежно від ступеня злоякісності пухлини, присутні пухлини, інтенсивність включення в яких нуклеотиду не відрізняється від фонової. В інших зразках цей показник значно різнився всередині гістологічних груп. Обговорюються умови, за яких зміни радіоактивності адекватно відображають індивідуальну чутливість клітин пухлини до хіміопрепаратів.

**Human glioma proliferative potential  
investigation in the short-term culture  
for determination to anablastic  
chemopreparations sensitivity**

*Vasilyeva I.G., Rozumenko V.D., Glavatsky A.Ya., Olexenko N.P., Galanta E.S., Chopik N.G.,  
Tsyubko O.I., Vashulenko T.N.*

$H^3$ -thymidine accumulation was investigated in the short-term cultures, which were obtained from 20 samples of human brain gliomas. It was confirmed that tumors with accumulation did not differ from the phone level in all histological groups. In other samples the level of labeled nucleothide was very different inside the histological groups. The conditions in wich radioactivity level changed that demonstrated the personal tumor's cells drug sensitivity were discussed.

**Комментарий**

*к статье Васильевой И.Г. и соавторов "Исследование пролиферативного потенциала глиом человека в краткосрочной культуре для определения чувствительности к антибластическим химиопрепаратам".*

В соответствии с современными представлениями успешная разработка рациональных схем антибластической химиотерапии глиом головного мозга невозможна без учета показателей пролиферации, поскольку между скоростью роста этих новообразований и их чувствительностью к противоопухолевым препаратам установлена тесная связь. Дальнейшее повышение эффективности комбинированного лечения глиом связано с углубленным изучением закономерностей их роста с привлечением новых методических подходов. Наряду с этим необходим поиск рациональных методов определения индивидуальной чувствительности глиом к различным антибластическим препаратам нового поколения.

В Институте нейрохирургии еще в 80-е годы прошлого столетия были начаты приоритетные исследования пролиферативной активности глиом методом гистоавторадиографии с использованием  $H^3$ -тимидина, в которых установлена корреляция между величиной индекса меченая ДНК-синтезирующей фракции клеток опухоли и степенью анаплазии глиом на биоптическом материале и в культуре ткани [2, 3, 5]. Особенно важное значение имело определение параметров клеточного цикла в пролиферирующей популяции глиом различной степени злокачественности для планирования тактики антибластической терапии у нейроонкологических больных [1].

В связи с этим актуальность представленной работы И.Г. Васильевой и соавторов несомненна, поскольку в ней поставлена цель изучить пролиферативный потенциал глиом разной степени злокачественности и их индивидуальную чувствительность к трем противоопухолевым препаратам *in vitro* с использованием современного методического подхода — измерения суммарной радиоактивности  $H^3$ -тимидина, включенного в пролиферирующие клетки глиом в период синтеза ДНК.

Результаты проведенных исследований показали значительные различия суммарной радиоактивности, включенной в суспензии клеток, во всех группах глиом. Благодаря целенаправленному анализу цифрового материала авторы условно выделили глиомы с низким уровнем включенной радиоактивности (до 100 имп./мин), средним (до 400 имп./мин), высоким (до 700 имп./мин) и очень высоким (более 1000 имп./мин). Такое, хотя и условное, распределение наблюдений позволило показать, что среди наиболее злокачественных типов глиом — глиобластом — как правило, нет опухолей с низким уровнем включенной радиоактивности, а преобладают средний (2), высокий (2) и очень высокий уровень этого показателя. Подобным образом проанализированы и группы астроцитом II и III степени злокачественности, а также наблюдения двух глиом сложного состава — олигодендроастроцитом.

В работе содержится продуманная трактовка столь широкой варибельности интенсивности включения  $H^3$ -тимидина в суспензию клеток злокачественных глиом с учетом фактора регионарной неоднородности их тканевой структуры, что определяется наличием в них некротических очагов, кист распада и расплавления, а также различиями объема сосудисто-стромального компонента.

С нашей точки зрения, большего внимания заслуживают те наблюдения, в которых выявлен неожиданно высокий уровень включенной радиоактивности, например, некоторые астроцитомы II степени злокачественности. Следует предположить, что в этих наблюдениях степень злокачественности глиом может оказаться более высокой, если есть возможность гистологического исследования биопсийного материала этих опухолей на максимально широком протяжении.

По нашему мнению, обнаружение низкого уровня включенной радиоактивности в суспензию клеток некоторых злокачественных глиом, предположительно, может быть обусловлено проведением этим больным дооперационной лучевой терапии или химиотерапии, поскольку биологическая активность таких "леченых" глиом значительно сни-

жается. Это подтверждается значительным снижением пролиферации или полным прекращением роста в условиях культивирования, а при гистологическом исследовании в таких глиомах обычно выявляют признаки лечебного патоморфоза с появлением обширных участков заместительного фиброзирования паренхимы [4, 6].

Тестирование противоопухолевой активности трех препаратов на суспензионных культурах 20 глиом проведено авторами по двум количественным показателям: уровню включенной суммарной радиоактивности  $H^3$ -тимидина и количеству “мертвых” (более адекватно — погибших или поврежденных) клеток. Отмечена значительная вариабельность ответа исследованных глиом на действие противоопухолевых препаратов, что подробно обсуждается авторами. Существенным представляется тот факт, что в некоторых наблюдениях значительное снижение суммарной включенной радиоактивности в суспензию клеток глиом (на 40–95%) часто сопровождалось увеличением количества поврежденных клеток (на 60–70%) в цитотоксическом тесте по сравнению с контрольными образцами тех же опухолей. Это может свидетельствовать о чувствительности к воздействию химиопрепаратов как пролиферирующих, так и покоящихся популяций клеток опухоли.

Существенный интерес представляет также выявленное авторами повышение интенсивности включения радиоактивной метки после инкубации суспензии клеток с антибластическими препаратами, что можно трактовать как индуцированную стимуляцию пролиферативного потенциала в таких глиомах. Этот феномен неоднократно описан в литературе, мы также наблюдали его.

Результаты проведенных авторами исследований обосновывают важность индивидуальной оценки чувствительности каждой удаленной опухоли (глиомы) к тому или иному антибластическому препарату в цитотоксическом тесте. Информативность апробированных в работе методов в большой мере обеспечивается количественным выражением ответа конкретной опухоли на воздействие химиопрепаратов, что позволяет объективизировать полученные данные в сравнительном аспекте и проводить их многосторонний анализ. Практически важна также возможность получения ответа о противоопухолевой активности тестируемых препаратов в короткие сроки.

Таким образом, представленные в статье материалы по изучению пролиферативного потенциала глиом и их чувствительности к антибластическим препаратам актуальны, основаны на исследовании достаточного материала, содержат новые факты, имеют важное практическое значение и могут быть рекомендованы для использования в клинической практике. Рубрикация разделов адекватна, библиография достаточна, охватывает публикации в основном последнего десятилетия.

*В.М. Семенова, доктор мед. наук,  
зав. лаборатории культивирования тканей  
Института нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины*

#### Цитированная литература

1. Бродская И.А. Значение исследований клеточного цикла для химиотерапии злокачественных опухолей головного мозга // *Нейрохирургия*. — 1981. — Вып.14. — С.86–90.
2. Бродская И.А., Миргородский О.А. Определение пролиферативной активности нейроэктодермальных опухолей головного мозга методом меченых ядер  $H$ -тимидином // *Морфология*. — 1978. — Вып.5. — С.3–6.
3. Верхоглядова Т.П., Семенова В.М. Некоторые особенности пролиферативной активности макроглиальных опухолей в культуре ткани // *Вопр. нейрохирургии*. — 1982. — №5. — С.36–41.
4. Главацкий А.Я., Семенова В.М., Олейник Г.М., Хмельницкий Г.В. Клинико-морфологическая оценка чувствительности глиобластом к антибластической терапии // *Бюл. УАН*. — 1998. — №4. — С.55–57.
5. Семенова В.М. Характеристика пролиферативной активности клеток макроглиальных опухолей головного мозга при культивировании *in vitro* // *Цитология*. — 1999. — №3–4. — С.310–311.
6. Семенова В.М. Экспериментально-морфологічна оцінка ефективності антибластичної терапії гліом головного мозку: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — К., 1993. — 29 с.