

УДК 616.831-006.484-009.6-076.5-018.1

## Оценка чувствительности глиальных опухолей мозга к воздействию темодала в цитотоксическом тесте

Орлов Ю.А., Семенова В.М., Стайно Л.П.

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

На краткосрочных суспензионных культурах изучена чувствительность 12 глиом головного мозга к воздействию темодала. Противоопухолевый эффект препарата оценен в тесте цитотоксичности с трипановым синим после инкубации культур с темодалом. Установлена вариабельность чувствительности клеток глиом к прямому воздействию различных концентраций темодала, что обосновывает необходимость ее определения перед началом лечения темодалом в каждом конкретном случае.

**Ключевые слова:** *глиальные опухоли, темодал, чувствительность, цитотоксический тест, суспензионные культуры.*

**Вступление.** Глиальные опухоли головного мозга составляют 50–60% всех опухолей центральной нервной системы. Как известно, результаты лечения этих новообразований остаются неудовлетворительными, а летальность высокой. Оптимизация результатов комбинированного лечения злокачественных глиом связана как с поиском новых эффективных антибластических препаратов, так и с использованием рациональных методов определения индивидуальной чувствительности этих опухолей к противоопухолевым препаратам.

В настоящее время основными требованиями к химиопрепаратам для применения их в нейроонкологии являются: способность преодолевать гематоэнцефалический барьер, низкая способность к связыванию белков крови, достижение адекватной концентрации в ткани головного мозга, высокая эффективность при первичных опухолях головного мозга, а также низкая нейротоксичность [5].

В последние годы появилось большое количество публикаций об использовании алкилирующего цитостатического препарата темодала (темозоломида), относящегося к группе имидазотетразинонов, при комбинированном лечении злокачественных опухолей головного мозга. Сообщения касаются глиобластом, анапластических астроцитом, олигодендроглиом, метастазов солидных опухолей в головной мозг [3, 6, 8, 12, 13, 18, 19].

Темозоломид был синтезирован в 1984 г. в Великобритании [15] и прошел длинный путь экспериментальных и клинических исследований. Пероральный способ применения препарата, хорошая переносимость, низкая токсичность, в том числе и гематологическая, отсутствие кумулятивного эффекта, высокая степень проникновения через гематоэнцефалический барьер и достаточно высокая эффек-

тивность позволили рекомендовать его для лечения опухолей мозга различного генеза и степени анаплазии как в качестве первой линии терапии злокачественных опухолей головного мозга, так и в комплексе комбинированной терапии после удаления опухолей, при рецидивах опухолей, а также в сочетании с лучевой терапией [11, 14, 16].

Однако, по данным литературы [7, 10, 13, 16] эффективность терапии глиом темодалом авторы оценивают неоднозначно, она варьирует в широких пределах: от констатации максимального ответа опухоли на лечение препаратом или стабилизации опухолевого процесса до отсутствия эффекта при идентичных гистобиологических вариантах опухолей мозга. При этом зависимость между степенью злокачественности опухолей мозга и уровнем их чувствительности к темодалу в этих работах не анализируется.

**Цель работы:** выяснение возможных причин разноречивости результатов лечения темодалом глиальных опухолей головного мозга. Для этого мы провели экспериментальное изучение прямого цитотоксического воздействия этого препарата на клетки глиом различной степени анаплазии на модели краткосрочных суспензионных культур, полученных из биоптического материала. По сравнению с эксплантационными тканевыми культурами определение индивидуальной чувствительности опухоли к тестируемым химиопрепаратам на клеточной суспензии имеет ряд преимуществ: способность к росту опухолевых клеток в этой системе не требуется, разрастания клеток стромы и клональный отбор сведены к минимуму, количественные результаты оценки цитотоксичности тестируемых препаратов могут быть получены в короткие сроки (на 2-е сутки). Ограничением метода является короткая продолжительность

опыта, что исключает возможность длительного наблюдения за воздействием тестируемых препаратов на опухолевые клетки в течение одного или нескольких клеточных циклов [17].

Оценку цитотоксичности исследуемых веществ в цитотоксическом тесте проводят путем количественного определения доли поврежденных опухолевых клеток, включивших в цитоплазму трипановый синий в опытных культурах, в сопоставлении с контрольными наблюдениями. По данным литературы [1, 2, 9], эту модель широко применяют в экспериментальных исследованиях для тестирования чувствительности различных клеток к воздействию разнообразных повреждающих факторов (химиопрепараты, токсины, радиация, магнитные поля).

**Материалы и методы.** Нами поставлено 12 опытов по тестированию чувствительности глиальных опухолей мозга к воздействию темодала на клетки глиом в суспензионных культурах. Предварительно в каждом наблюдении изучили гистоструктурные особенности удаленных на операции опухолей с учетом выраженности в их ткани клеточного полиморфизма и клеточной плотности, особенностей васкуляризации, проявлений дифференцировки, распространенности некрозообразования, а также уровня митотической активности. В соответствии с этим у 5 больных диагностировали астроцитомы II степени злокачественности, у 3 — анапластические астроцитомы III степени злокачественности, у 4 — глиобластомы (IV степень злокачественности). Оценку гистоструктуры и степени злокачественности глиом проводили согласно современной гистобиологической классификации опухолей нервной системы [4].

Краткосрочные суспензионные культуры глиом получали из биоптического материала по общепринятой стандартной методике [17]. Культуры инкубировали с темодалом в концентрациях 12,5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл на протяжении 24 ч. Выбор тестируемых концентраций темодала проводили согласно инструкции с учетом рекомендуемых доз препарата, применяемых в нейроонкологической практике (150–200 мг/м<sup>2</sup>), что позволило приблизиться к условно терапевтическим концентрациям препарата в крови больных с перерасчетом на 1 мл питательной среды в суспензионных культурах.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ полученных результатов показал, что клетки высокодифференцированных астроцитом II степени анаплазии неоднозначно реагируют на прямое воздействие минимальных концентраций темодала (12,5 мкг/мл). В трех наблюдениях процентная доля поврежденных клеток

была достаточно высокой и составила 47,2, 56,6% и 62,3% соответственно. Однако в одном наблюдении этот показатель оказался равным только 19%, а в другом — повреждения клеток вообще не отмечено. С увеличением концентрации препарата до 25 мкг/мл эффективность воздействия темодала на опухолевые клетки культур возрастала от 57,4 до 72%. Дальнейшее увеличение концентрации препарата до 50 мкг/мл сопровождалось увеличением количества поврежденных клеток, но уже не столь значительным (от 73 до 82,2%) (табл. 1).

**Таблица 1. Содержание поврежденных клеток в суспензионных культурах глиом II степени анаплазии после воздействия различных концентраций темодала**

Наблюдение, №	Повреждение клетки после инкубации с темодалом в концентрациях (мкг/мл), %		
	12,5	25	50
I наблюдение	47,2	57,4	73,0
II наблюдение	56,6	66,6	77,5
III наблюдение	62,3	72,0	79,4
IV наблюдение	0	58,9	73,6
V наблюдение	19,0	72,0	82,2

Таким образом, повышение тестируемых концентраций темодала сопровождается увеличением доли поврежденных клеток в суспензионной культуре астроцитом II степени злокачественности.

При определении индивидуальной чувствительности к темодалу клеток анапластических глиом III степени анаплазии в цитотоксическом тесте получены почти идентичные результаты. В двух наблюдениях при наименьшей (12,5 мкг/мл) концентрации темодала доля поврежденных клеток составила 41,6% и 47,7%, а в одном наблюдении она достигла только 12%. Увеличение концентрации препарата до 25 мкг/мл сопровождается увеличением повреждаемости клеток, хотя и не достигает того уровня, которое наблюдается в аналогичных пробах с глиомами II степени анаплазии при тестировании этой же концентрации темодала. Повышение концентрации темодала до 50 мкг/мл в двух наблюдениях не вызвало существенного нарастания повреждаемости опухолевых клеток. В одном из наблюдений при относительно низкой чувствительности клеток к воздействию малых (12,5 мкг/мл) концентраций темодала отмечали сохранение этой тенденции при воздействии и более высоких концентраций препарата: при 25 мкг/мл доля поврежденных клеток составила только 20%, а при 50 мкг/мл этот показатель достиг 52,2% (табл. 2).

**Таблица 2. Содержание поврежденных клеток в суспензионных культурах глиом III степени анаплазии после воздействия различных концентраций темодала**

Наблюдение, №	Поврежденные клетки после инкубации с темодалом в концентрациях (мкг/мл), %		
	12,5	25	50
I наблюдение	47,7	62,3	65,3
II наблюдение	41,6	64,3	65,2
III наблюдение	12,2	20,0	52,2

Таким образом, уровни количественных показателей цитотоксичности высокой концентрации темодала, воздействующей на клетки глиом III степени злокачественности, оказываются более низкими по сравнению с таковыми при тестировании глиом II степени злокачественности.

Клетки глиобластом в суспензионных культурах также по-разному реагировали на воздействие темодала. В 3 наблюдениях получен положительный ответ на воздействие малой (12,5 мкг/мл) концентрации темодала, которая вызвала повреждение 21,9–53,1% опухолевых клеток. В одном из наблюдений зафиксирован минимальный (отрицательный) ответ на воздействие этой же концентрации — процент снижения поврежденных клеток составил только 3,5. Увеличение концентрации препарата в наблюдениях с положительной реакцией клеток глиобластом на малые концентрации сопровождалось увеличением числа поврежденных клеток по мере повышения концентрации препарата. Однако в случае с низкой чувствительностью опухолевых клеток к воздействию наименьшей концентрации темодала (IV наблюдение), увеличение концентрации препарата лишь незначительно усиливало цитотоксический эффект (табл. 3).

Таким образом, сравнительный анализ количественных показателей цитотоксичности темодала в отношении клеток глиом в суспен-

**Таблица 3. Содержание поврежденных клеток в суспензионных культурах глиобластом IV степени анаплазии после воздействия различных концентраций темодала**

Наблюдение, №	Поврежденные клетки после инкубации с темодалом в концентрациях (мкг/мл), %		
	12,5	25	50
I наблюдение	37,5	56,6	61,1
II наблюдение	53,1	63,5	83,5
III наблюдение	21,9	66,2	79,0
IV наблюдение	3,5	3,5	5,0

зионных культурах показывает, что в условиях этой экспериментальной модели препарат проявляет достаточно высокую противоопухолевую активность в большинстве наблюдений независимо от степени анаплазии исходной опухоли.

В большой мере это объясняется многосторонним механизмом антибластического действия темодала на опухолевые клетки культур. Как известно [3, 12, 14, 15], этот препарат ингибирует механизмы репарации опухолевых клеток и синтез ДНК путем подавления активности ферментов, ответственных за эти процессы, а также повышает иммуногенность опухолей. Помимо этого причиной высокой чувствительности к воздействию темодала клеток большинства глиом является обеспечение прямого контакта опухолевых клеток с препаратом в условиях данного эксперимента.

Нами также установлено, что увеличение тестируемых концентраций темодала обычно сопровождается увеличением доли поврежденных опухолевых клеток, что указывает на дозозависимость цитотоксического эффекта темодала в отношении опухолевых клеток большинства глиом. В то же время выявляются различия индивидуальной чувствительности клеток глиом к малым, средним и высоким концентрациям темодала, что обосновывает необходимость ее предварительного определения перед назначением нейроонкологическим больным темодала с уточнением оптимальных доз препарата с целью получения максимального лечебного эффекта.

**Выводы.** 1. Исследование прямого воздействия темодала на краткосрочные суспензионные культуры глиальных опухолей подтвердили его высокую противоопухолевую активность независимо от степени анаплазии исходных опухолей.

2. Обнаружение цитотоксического воздействия темодала на клетки высокодифференцированных глиом II степени злокачественности обосновывает необходимость проведения исследований по проверке данного явления в клинической практике.

3. Количественные показатели повреждаемости опухолевых клеток возрастают с повышением тестируемой концентрации темодала, но не пропорционально ее увеличению.

4. В диапазоне тестируемых концентраций (12,5–50,0 мкг/мл) темодал не вызывает повреждения всех опухолевых клеток, что указывает на наличие в глиомах популяций клеток, абсолютно резистентных к воздействию малых концентраций темодала, но чувствительных к высоким его концентрациям, а также клеток с низкой чувствительностью к темодалу независимо от его концентрации.

5. Обнаружение индивидуальной чувствительности глиом к прямому воздействию темодала на клетки глиальных опухолей обосновывает необходимость ее определения перед назначением темодала.

6. Для повышения эффективности антибластического действия темодала, по-видимому, целесообразно сочетание алкилирующего воздействия, которым обладает темодал, с назначением препаратов других механизмов действия и лучевой терапии.

### Список литературы

- Андрянов Ю.В., Андрянова О.И., Голованов М.В. и др. Влияние импульсных электрических полей и акустических ударных волн на культивируемые клетки / Междунар. симпоз. Биология клетки в культуре // Цитология. — 1999. — Т.41, №3-4. — С.257-258.
- Гоц Т.Ю. Вплив цитокінів та дексаметазону на альвеолярні макрофаги людини // Лаб. діагностика. — 2001. — Т.1. — С.15-18.
- Желудкова О.Г., Тарасова И.С., Горбатов С.В. и др. Лечение анапластических астроцитом и глиобластом у детей с использованием темодала // Соврем. онкология. — 2002. — Т.4, №2. — С.60-62.
- Зозуля Ю.А., Верхоглядова Т.П., Шамаев М.И., Малышева Т.А. Гистобиологические принципы классификации опухолей нервной системы и ее клиническое значение // Укр.нейрохирург. журн. — 2001. — №1. — С.32-41.
- Орел Н.Ф. Новые цитостатики в лечении злокачественных опухолей // Под ред. Горбуновой В.А. — М., 1998. — С.25-39.
- Орлов Ю.А., Климинюк Г.И., Шаверский А.В. Опыт применения темодала при опухолях головного мозга у детей / Материалы III съезда нейрохирургов Украины. — 2003. — С.98.
- Орлов Ю.А., Семенова В.М. Цитостатическое действие темодала на культуру тканей глиальных опухолей / Материалы III съезда нейрохирургов Украины. — 2003. — С.22-23.
- Поддубная И.В. Новый век — новые возможности химиотерапии: темодал в лечении злокачественных опухолей // Соврем. онкология. — 2002. — Т.4, №1. — С.12-15.
- Шишацкая Е.И., Еремеев А.В., Готельзон И.И. Исследование цитотоксичности полиоксиканоатов при действии их на культивируемые животные клетки / Междунар. симпоз. Биология клетки в культуре // Цитология. — 2001. — Т.43, №9. — С.904.
- Avgtropoulos N.G., Batchelor T.T. New Treatment Strategies for Malignant Gliomas // The Oncologist. — 1999. — V.4, №3. — P.209-224.
- Chinot O., Honore S., Dufour H. et al. Safety and efficacy of temozolomid in patients with recurrent anaplastic oligodendrogliomas after standart radiotherapy and chemotherapy // J. Clin. Oncol. — 2001. — V.19. — P.2449-2455.
- Fridman H.S., Dolan M.E., Pegg A.E. et al. Activity of temozolomide in the treatment of central nervous system tumor / Cancer Pes. — 1995. — V.55. — P.2853-2857.
- Levin V.A., Yung A., Prodos M. et al. Temodal (temozolomide) at first relapse in anaplastic astrocytoma patients // J. Neurooncol. — 1997. — V.35 (suppl. 1). — P.185.
- Newlandas E.S., Blackledge G.R., Slack J.A. et al. Phase I trial temozolomide // Br. J. Cancer. — 1992. — V.65. — P.287-291.
- Stevens M.F.G., Hickman J.A., Langdon S.P. et al. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbonyl-3-methyl-imidazo [5,1-d]- 1,2,3,5-tetrazin-4 (3H)-one (CCPG 81045\$ M&B 39831), a novel drug with potential as an alternative dacarbazine // Cancer Res. — 1987. — V.47. — P.5846-5852.
- Stupp R., Dietrich P. et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide // J. Clin. Oncol. — 2002. — V.20. — P.1375-1382.
- Wilson A.P., Neal F.E. / Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р.Фрешни. — М.: Мир, 1989. — С.256-303.
- Yung A., Prodos M., Yaya-Tur R. et al. Temodal at first relapse in anaplastic astrocytoma patients // J. Clin. Oncol. — 1999. — V.17, №9 — P.2762-2771.
- Yung A., Albright R.E., Olson J. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse // Brit. J. Cancer. — 2000. — V.83, №5. — P.588-593.

### Оцінка чутливості гліальних пухлин мозку до впливу темодалу у цитотоксичному тесті Орлов Ю.О., Семенова В.М., Стайно Л.П.

На короткострокових суспензійних культурах вивчено чутливість 12 гліом головного мозку до впливу темодалу. Протипухлинний ефект препарату оцінений за тестом цитотоксичності з трипановим синім після інкубації культур з темодалом. Встановлено варіабельність чутливості клітин гліом до прямої дії темодалу в різній концентрації, що обґрунтовує необхідність її визначення перед початком хіміотерапії з використанням препарату у кожного хворого.

### Estimation of sensitivity of brain's gliomas to the influence of temodal in citotoxicity test Orlov Y.A., Semenova V.M., Staino L.P.

The sensitivity of 12 brain's gliomas to the influence of temodal was studied on shortterm suspension cultures. Anti-tumor effect of the preparation was estimated using citotoxicity test after their incubation with temodal. The variation sensitvity of glioma's tumour cells to the direct influence of different concentration of temodal was detected, therefore in every concrete case, there is a necessity to difine the sensitivity before starting the chemotherapy with temodal.

**Коментар**

*до статті Орлова Ю.А., Семеновой В.М., Стайно Л.П. “Оценка чувствительности глиальных опухолей мозга к воздействию темодала в цитотоксическом тесте”*

Наукові дослідження, присвячені застосуванню антибластичної хіміотерапії в лікуванні злоякісних пухлин головного мозку, насамперед, гліального походження, здійснюють понад 25 років. Недостатня ефективність існуючих хіміопрепаратів та стандартних схем їх використання, значна частота ускладнень, спричинених їх нейротоксичною, мієлосупресивною, нефротоксичною дією, зумовлює песимізм та стримане ставлення до цього методу лікування. Тому поява нового протипухлинного препарату, який перший за останні 20 років (M. Stevens та співавт.) синтезований для використання саме в нейроонкології, є визначною подією для клініцистів.

Темозоламід (темодал) — цитостатичний алкілюючий препарат другого покоління, що належить до класу імідазотетразинів, основний механізм дії якого — метилування ДНК. Крім того, темодам здатний пригнічувати активність ферментів, що відповідають за репарацію ДНК, це один з основних механізмів його дії, який дозволяє подолати хіміорезистентність клітин пухлини, що досить швидко росте при застосуванні інших алкілюючих агентів і, насамперед, препаратів — похідних нітрозосечовини. Темодам відповідає більшості вимог, які пред'являють до хіміопрепаратів, що можуть бути застосовані в нейроонкології, це стосується його високої протипухлинної активності та проникності крізь гематоенцефалічний бар'єр, прийнятного профілю побічних реакцій, зручності застосування (всередину). Важливою властивістю препарату є його спонтанний гідроліз в активний компонент МТІК (обминаючи гепатобіліарний бар'єр), з якого походить іон метилдіазоніуму, що реалізує цитотоксичні ефекти темодаму. Наявність цього ефекту дозволила авторам провести на моделі суспензійних культур, отриманих з біоптату, експериментальне вивчення прямого цитотоксичного впливу препарату на клітини гліоми різного ступеня анаплазії. Використання саме цієї моделі загальноприйняте під час проведення наукових досліджень з тестування чутливості клітин пухлини до впливу різних пошкоджуючих чинників.

Найбільш цікавим, на мою думку, є висновок авторів відносно існуючої індивідуальної чутливості гліоми до впливу темодаму та необхідності її обов'язкового визначення перед проведенням хіміотерапії. Він співпадає з отриманими нами результатами визначення індивідуальної чутливості до темодаму в тесті з глутатіонтрансферазою *in vitro*. Проте висновки, що стосуються дозозалежності дії препарату при гліомі різного ступеня анаплазії, дещо передчасні, оскільки для отримання статистично значущих даних необхідна більша, ніж 12, кількість спостережень.

Дискутабельним питанням у нейроонкології є доцільність проведення хіміотерапії за наявності відносно доброякісної гліоми (анаплазія II ступеня), оскільки протягом тривалого часу панувала думка про первинну хіміо- та радіорезистентність цих пухлин, і їх лікування обмежували хірургічним втручанням. Заслуговує на увагу і є, на мій погляд, вірним принцип наукового підходу авторів під час вивчення ефективності хіміопрепарату при гліомі не тільки III–IV ступеня анаплазії, а й високодиференційованої астроцитомі. В літературі є повідомлення про успішне лікування пухлин II ступеня анаплазії, але це стосувалось тільки олігодендрогліоми та олігодендроастроцитомі. Зважаючи на це, дослідження з вивчення ефективності темодаму при гліомі низького ступеня анаплазії безперечно слід продовжити не тільки в експерименті, а й в клініці.

*О.Я. Главацький, доктор мед. наук,  
ст. наук. співроб. клініки внутрішньомозкових пухлин  
Інституту нейрохірургії ім.акад.А.П.Ромоданова АМН України*