

УДК 616. 831—006.484:615.28

Применение метода краткосрочного культивирования опухолевых клеток для определения индивидуальной чувствительности глиом головного мозга к химиопрепаратам

Зозуля Ю.А., Васильева И.Г., Розуменко В.Д., Олексенко Н.П.,
Главацкий А.Я., Чувашова О.Ю.

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

Ключевые слова: глиома, индивидуальная чувствительность, ³H-тимидин

Введение. Успех лечения глиом головного мозга во многом зависит от выбора хирургической тактики и эффективности химиотерапевтических препаратов. Необходимость индивидуального подхода к назначению химиопрепаратов подтверждается рядом исследований, свидетельствующих о различной чувствительности глиом мозга к противоопухолевым средствам [6,7,9]. Результаты научных исследований последнего десятилетия во многом объясняют молекулярные механизмы индивидуальной чувствительности и устойчивости трансформированных клеток к лекарствам [6,7,11]. В настоящее время доказано значение глутатиона, глутатионтрансферазы, алкилтрансферазы, а также ферментов, участвующих в репарации ДНК, в повышении устойчивости опухолей к медикаментозной терапии [8,11]. Определена роль в формировании фенотипа, устойчивого к противоопухолевым препаратам, белков MDR и P-гликопротеина [5]. В то же время установлено, что среди глиом встречаются дефицитные по алкилтрансферазе популяции, особенно чувствительные к алкилирующим препаратам [8]. Многообразие механизмов резистентности и ее индивидуальной выраженности в клетках различных видов опухолей определяет разную их чувствительность к химиопрепаратам. В связи с этим существует необходимость создания адекватных тестов для определения индивидуальной чувствительности глиом к химиопрепаратам [9].

Целью нашего исследования была оценка метода краткосрочного органного культивирования опухолевых клеток для определения чувствительности глиом головного мозга человека к химиопрепаратам с различным механизмом действия: карбоплатину, флуороурацилу, винкристину, ломустину. Выбор этих препаратов обусловлен принадлежностью каждого из них к одному из четырех типов соединений (лекарства, генерирующие разрывы ДНК, антимета-

болиты, алкилирующие соединения и растительные вещества, вызывающие денатурацию тубулина), наиболее широко используемых при химиотерапии внутримозговых опухолей [4].

Для тестов использовали ткань внутримозговых глиальных опухолей человека, удаленных во время операции. Чувствительность клеток этих опухолей к химиопрепаратам определяли по снижению интенсивности включения ³H-тимидина в ДНК опухолевых клеток в культуре. Меченый нуклеотид, включившийся во вновь синтезирующуюся ДНК, позволяет оценить митоз в клетке. Снижение интенсивности его включения адекватно торможению деления клетки и, следовательно, роста опухоли.

Материал и методы. В ходе исследования было протестировано 13 образцов опухолей головного мозга человека, преимущественно глиом разной степени злокачественности. Ткань удаленной в ходе операции опухоли до начала исследований (сроком до 24 ч) помещали в пенициллиновый флакон с инкубационной средой "Игла" при температуре 37°C. Перед культивированием с ³H-тимидином ткань освобождали от сосудов и измельчали до получения тканевых эксплантатов массой 10—15 мг, просушивали с помощью фильтровальной бумаги, взвешивали и помещали в пенициллиновые флаконы с культуральной средой "Игла", содержащей ³H-тимидин (75 мкCi / мл) и химиопрепараты (19 мкг/мл карбоплатина, 107 мкг/мл флуороурацила, 1,5 мкг/мл винкристина, 16 мкг/мл ломустина). При расчете концентрации препарата для проведения тестов *in vitro* учитывали допустимые его уровни в крови при назначении в клинике. Клетки опухоли культивировали при температуре 37°C в течение 4 ч [4].

Включение ³H-тимидина определяли с помощью сцинтилляционного счетчика "Бета-1" ("Медаппаратура", 1983)

Результаты и обсуждение. Индивидуаль-

ную чувствительность опухоли к химиопрепаратам необходимо учитывать при разработке стратегии химиотерапии. Определяется чувствительность к химиопрепаратам генетически детерминированной активностью систем резистентности клетки к инородным молекулам [3, 10]. Доказано, что в формировании резистентности опухолевой клетки к химиопрепаратам имеют значение глутатионтрансфераза, алкилтрансфераза, ДНК-лигаза, глутатион, белки MDR и Р-гликопротеин [5,8,9,11,12]. Однако, при выборе эффективного препарата обычно руководствуются только данными токсикологических тестов, направленных на определение толерантности пациента к данному препарату.

Для решения задачи индивидуального подбора химиопрепарата мы применяли культивирование опухолевых клеток, полученных непосредственно во время операции, в присутствии противоопухолевых лекарств. Основанием для оценки эффективности лекарства была степень угнетения под его воздействием включения ^3H - тимидина в синтезирующуюся ДНК, поскольку этот показатель отражает интенсивность роста ткани опухоли и широко используется для определения ее чувствительности к химиопрепаратам [1,2].

В ходе экспериментальных исследований было установлено, что для получения надежных и воспроизводимых результатов очень важно соблюдать следующие условия культивирования тканевых эксплантатов.

1. Образец опухоли необходимо сразу поместить в культуральную среду стандартного состава. До проведения эксперимента допускается выдерживание этого образца в течение 24 ч в термостате при температуре 37°C .

2. Масса инкубируемых эксплантатов должна равняться в среднем 10 мг.

С целью определения оптимального размера тканевых эксплантатов в культуральную среду с ^3H -тимидином помещали эксплантаты одной и той же опухоли разной массы и культивировали в течение 24 часов (таблица 1). В результате этого эксперимента было выявлено, что оптимальная масса культивируемых эксплантатов составляет 7—12 мг. При этом допустимые границы колебания уровня включения ^3H -тимидина в ДНК опухолевой клетки не превышают 10%.

3. Оптимальное время культивирования — 4—24 ч.

Для определения оптимальной продолжительности культивирования образцы одной и той же опухоли культивировали 1 ч, 4 ч, 24 ч в присутствии ^3H -тимидина. Установлено, что если уровень включения ^3H тимидина через 24 ч принять за 100%, то через 1 ч он включается

Таблица 1. Влияние массы эксплантата опухолевой ткани на интенсивность включения ^3H - тимидина в ДНК опухолевой клетки

Масса эксплантата, мг	Интенсивность включения ^3H - тимидина	
	имп/мин	имп/мин/мг ткани
11	4077	370
9	2753	305
8	2132	354
		$M \pm m$ 343 \pm 25
43	7612	177
55	15042	273
57	11717	205
		$M \pm m$ 218 \pm 36
67	8881	132
94	6080	64
		$M \pm m$ 98 \pm 34

на 34%, через 2 ч — на 45%, а через 4 ч — на 68% метки (рис.).

4. Однородность образцов для культивирования.

Образец опухолевой ткани нередко содержит значительное количество соединительнотканых тяжей, что не позволяет получить однородные по составу участки и обуславливает разноречивость данных относительно уровня

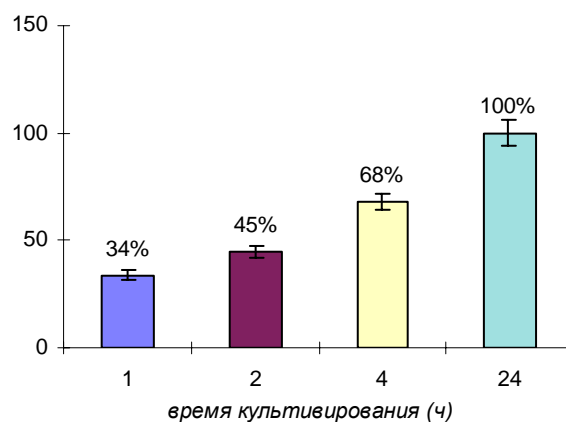


Рис. Накопление ^3H -тимидина в опухолевых клетках через 1, 2, 4, 24 ч культивирования

включения тимидина, выходящую за допустимые границы стандартного отклонения. Поэтому можно получить однородную клеточную суспензию, чтобы вносить в культуральную среду до 10^6 клеток (подсчет проводят в камере Горяева).

Исследования показали, что в культуре клетки глиом с включением ^3H -тимидина проявляют различную чувствительность к карболатину, флюороурацилу, винкристину, ломустину (табл. 1). Через 4 ч культивирования под влиянием химиопрепарата достигается подавление включения ^3H -тимидина на 20—50% и

Таблица 2. Влияние химиопрепаратов карбоплатина, флуороурацила, винкристина, ломустина на включение ³H-тимидина в клетки нейроглиом в культуре (имп/мин/мг ткани)

Диагноз	Конт-роль	Карбо-платин	Вин-крис-тин	Флуоро-урацил	Лому-стин
Анапластическая олигодендро-астроцитомы Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	248	130 >40%	98 >50%	147	—
Анапластическая олигодендро-астроцитомы III степени Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	170	75 >60%	132	169	160
Анапластическая олигодендро-астроцитомы III степени Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	156	146	115	79 >50	57 >70
Анапластическая астроцитомы Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	262	214	206	79 >70	73 >70
Анапластическая астроцитомы Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	392	446	277 >40	270 >40	392
Олигодендроастроцитомы Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	303	332	146 >50	236	407
Олигодендроастроцитомы II степени Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	913	1042	665 >30	682	949
Астроцитомы III степени Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	185	122	119	118	74 >50
Астроцитомы II-III степени Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	358	333	362	325	263 >20
Субэпендимная астроцитомы Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	305	345	187	126 >50	392
Глиобластома Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	906	487	538	378 >50	766
Ганглиоэпендимная глиобластома Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	474	454	511	258 >40	316
Астроцитомы III степени Снижение интенсивности включения ³ H-тимидина	511	431	329	275 >40	433

более. При этом флуороурацил оказался наиболее эффективным в 7 случаях, винкристин — в 4 случаях, ломустин — в 4 случаях и карбоплатин — в 2 случаях. Некоторые образцы опухоли были чувствительны к двум препаратам. При этом чувствительность опухоли к тому или иному препарату от гистологического диагноза не зависела (табл.2).

Следует отметить, что контрольные образцы опухолей характеризовались различной интенсивностью включения ³H-тимидина, что, по видимому, связано с генетически детерминированными различиями активности ферментов, участвующих в синтезе ДНК и регуляции клеточного цикла.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют об эффективности метода краткосрочного органного культивирования опухолевых клеток для определения индивидуальной чувствительности внутримозговых глиом к химиопрепаратам.

Список литературы

1. Бондарь Г.В., Кайряк О.В., Лисовская Н.Ю. и др. Определение чувствительности к 5-фторурацилу у больных злокачественными опухолями различных локализаций // Антибиотики и химиотерапия. — 1999 — Т.44. — №2. — С.25—29.

2. *Культура животных клеток. Методы/* Под ред. Р. Фрешни. М.: Мир, 1989. — С. 256—302.
3. Лихтенштейн А.В., Шапот В.С. Опухолевый рост: ткани, клетки, молекулы // Патолофизиология и экспериментальная химиотерапия. — 1998. — №3. — С.25—49.
4. *Противоопухолевая терапия /*Под ред. Н.И. Переводчиковой.— М.: Медицина, 1993. — С.121—122.
5. Abe T., Hasegawa S., Taniguchi K., Yokomizo A., Kuwano T., Iino M., Mori T., Hori S., Kohno K., Kuwano M. Possible involvement of multidrug-resistance-associated protein (MRP) gene expression in spontaneous drug resistance to vincristine, etoposide and adriamycin in human glioma cells// Cancer Res.—1992— V. 52.— N11.— P.3029—3034.
6. Alvarez M., Robey R., Sandor V., Nishiyama K., Hatsumoto Y., Paull K., Bates S., Fojo T. Using the national cancer institute anticancer drug screen to assess the effect of MRP expression on drug sensitivity profiles // Mol. Pharmacol. — 1998.— V.54.— N5.— P.802—814.
7. Balmaceda C. Advances in brain tumor chemosensitivity // Tumori. — 1999.— Sep—oct;83 —. P.17—20
8. Barranco S.C., Kurm M.E. Direct drug sensitivity

- test (KKS)// Cell proliferation.—1993.— V.26.— N 4.— P.369.
9. *Jordan J.P., Hand C.M., Markowitz R.S., Black P.* Test for chemotherapeutic sensitivity of cerebral gliomas: use of colorimetric MTT assay// *J Neurooncol.*— 1992.— V.14.— N1.— P.19—35.
10. *Molecula genetics of drug resistens.* Ed. by J.K. Hayes and C.R. Wolf. Amsterdam, Harwood Academic Publishers. — V.1997.— 412p.
11. *Petrini M., Galimberti S.* Treatment of multidrug resistance in oncology and hematology // *Tumori.*— 1997.— 83(5 Suppl).— P.17—20.
12. *Schold S.C., Friedman H.S., Brent T.P. et al.* κ 6-alkylguanine-KNA alkyltransferase in primary central nervous system neoplasm// *J. Neuroncol.* —1989.— Suppl.— P.25.

Застосування короткострокового культивування пухлинних клітин для визначення індивідуальної чутливості гліом головного мозку до хіміопрепаратів

Зозуля Ю.П., Васильєва І.Г., Розуменко В.Д., Олексенко Н.П., Главацький О.Я., Чувашова О.Ю.

Гліоми людини мають чітко виражену індивідуальну чутливість до хіміопрепаратів. Для визначення найбільш ефективних протипухлинних препаратів доцільно проводити тестування тканини пухлини. Ми пропонуємо використовувати для цього тест із включенням H^3 -тимідину в пухлинні клітини в умовах коротких строків культивування тканинних трансплантатів. Отримані результати можуть застосовуватись у клінічній практиці.

Using short-term organ culture for the human brain gliomas individual drug sensitivity.

Zozulia Y.A., Vasilyeva I.G., Rozumenko V.K., Alexenko N.P., Glavatsky A.Y., Chuvashova O.Y.

Human gliomas have clear expressed individual drug sensitivity. For determination most effective medicine tumor tissue must be tested. We propose to use for this matter H^3 -thymidine incorporation test on the short-term cultures. Received results can be used in the clinical practis.