

УДК 616-006.484.04-092.9.259:612.017:615.277.3

Лісяний М.І., Бельська Л.М., Ключникова А.І.

Імуномодулююча та протипухлинна дія препаратів чистотілу на пухлини головного мозку

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ

Значне поширення злоякісних пухлин ЦНС, тенденція до збільшення частоти виявлення, незадовільні результати комбінованого лікування зумовили необхідність пошуку та розробки нових підходів до лікування нейроонкологічної патології.

Підвищення ефективності лікування пухлин головного мозку пов'язують з застосуванням препаратів, які, поряд з протипухлинною дією, справляють імуномодулюючий вплив та здатні відновлювати активність імунних реакцій організму хворого, оскільки в багатьох дослідженнях доведено, що утворення злоякісних гліом супроводжується значними розладами в системі імунітету [1–4]. Останнім часом проводяться дослідження з оцінки ефективності у комплексі реабілітації пацієнтів з онкологічними захворюваннями препаратів рослинного походження, що характеризуються низькою токсичністю, вираженими регуляторними властивостями, можливістю тривалого застосування. До таких препаратів належать амітозин (алкілований тіофосфамідом алкалоїд чистотілу великого та україн (похідне алкалоїдів чистотілу великого та тіофосфорної кислоти). Ці препарати проявляють широкий спектр протипухлинної дії та імуномодулюючі властивості при застосуванні в експериментальній і клінічній онкології. *In vitro* доведена пряма цитотоксична дія амітозину на клітини пухлин гострого лімфобластного лейкозу людини [5], тетрабластоми яєчників людини (клітини лінії PA-1)[6], карциноми Ерліха та лімфоми NK/Ly [7]. При введенні амітозину тваринам з експериментальною саркомою-37, карциномою Ерліха [8] та карциномою Льюїса (КЛ) [9] відзначене гальмування росту цих пухлин. Численні дослідження, проведені *in vitro*, підтвердили протипухлинну дію україн при пухлинах молочної залози, підшлункової залози, дрібноклітинного та недрібноклітинного раку легень, різних видах саркоми, лімфоми і меланоми [10, 11]. Показана антипроліферативна та цитотоксична дія україн на клітини медулобластом в суспензійних культурах [12]. В той же час, протипухлинна дія препаратів на злоякісні гліоми мозку та імуномодулюючий вплив на імунокомпетентні клітини цих препаратів недостатньо вивчені.

Метою роботи було вивчення впливу препаратів амітозин та україн на деякі властивості імунокомпетентних клітин крові людини та особливостей їх протипухлинної дії на експериментальну перевивну гліому мозку (штам 101.8).

Матеріали і методи дослідження. Матеріалом дослідження є гепаринізована кров 13

умовно здорових донорів і 14 біоптатів внутрішньомозкових пухлин різного генезу, отриманих під час нейрохірургічних втручань. За даними гістологічного дослідження пухлини головного мозку верифікували відповідно до Міжнародної гістологічної класифікації пухлин ЦНС [13]. Клітини пухлини виділяли відповідно до рекомендацій [14]. Тканину пухлини з біопсійного матеріалу отримували під час оперативного втручання і вміщували у середовище Ігла. Фрагменти тканини подрібнювали, відмивали шляхом центрифугування у поживному середовищі та використовували для подальших досліджень. Життєздатність клітин оцінювали у стандартному тесті шляхом вітального фарбування 0,2% розчином трипанового синього [14].

Для отримання мононуклеарних клітин венозну кров умовно здорових донорів нашарували на градієнт фікол-верографіну ($d=1,077$), центрифугували протягом 30 хв зі швидкістю 1500 об./хв [15]. Далі мононуклеари відмивали і ресуспензували в поживному середовищі Ігла.

Фенотип мононуклеарів вивчали з використанням моноклональних антитіл непрямим імунофлуоресцентним методом за протоколом цитофлуориметрії FACS Calibur [16], визначали субпопуляції мононуклеарів: CD25⁺ (активовані лімфоцити, що експресують α -ланцюг рецептора ІЛ-2); HLA-DR-антиген; CD95⁺ (клітини, що експресують FASR).

Цитотоксичну дію препаратів визначали *in vitro* за МТТ-колориметричним методом [17]. Розчини препаратів амітозин та україн додавали до суспензії виділених пухлинних та імунокомпетентних клітин та інкубували протягом 24 год при температурі (37±0,5)°С. Тестували такі концентрації препаратів: амітозин — 10 мкг/мл, 100 мкг/мл, 1000 мкг/мл; україн — 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 100 мкг/мл.

Цитотоксичну дію препаратів на клітини пухлин визначали шляхом вітального фарбування 0,2% розчином трипанового синього та в МТТ-тесті [17], основою на здатності живих клітин перетворювати розчинний жовтий бромід 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-тетразолію (МТТ) у нерозчинні пурпурно-сині внутрішньоклітинні кристали МТТ-формагану (МТТ-Ф). Оптичний сигнал, що визначали в діапазоні довжини хвиль поглинання МТТ-Ф (540–570 нм) після його розчинення, прямо пропорційний кількості життєздатних клітин. Результат, отриманий в МТТ-тесті, визначали як цитотоксичний індекс (ЦІ) [17].

Вплив препаратів на перебіг експериментальної перевивної гліоми 101.8 вивчали на 60 білих безпородних щурах масою тіла 90

г, яких утримували в стандартних умовах віварію Інституту. Дослідження проводили за дотримання принципів роботи з експериментальними тваринами. Як модель росту пухлини використовували перевивну злоякісну гліому мозку щурів (штам 101.8), яка за даними гістологічного дослідження характеризується одночасною малігнізацією астроцитарного, олігодендрогліального й епендимарного компонентів, а також інфільтративним вrostанням в прилеглу тканину мозку, що є ознакою злоякісних пухлин. За гістобіологічними властивостями ця гліома близька до злоякісних гліом мозку людини [18]. Для моделювання росту гліоми в мозку щурів клітини перевивної гліоми в кількості 1×10^6 імплантували в ліву тим'яну ділянку щурів [19]. Дію препаратів чистотілу (україну та амітозину) і цисплатину як препарату, що досить ефективно застосовують для лікування пухлин мозку, вивчали після їх введення тваринам з перевивною гліомою 101.8, тваринам контрольної групи вводили розчинник препарату. Лікування щурів з гліомою мозку починали через 3 або 8 діб після імплантації клітин гліоми 101.8 протягом 10 діб. Залежно від схеми дослідів тварини розподілені на 3 групи:

– 1-ша група, порівняльне дослідження п'ятиразового введення амітозину (по 10 мг) та україну (по 50 мкг екстракту чистотілу в об'ємі 0,2 мл);

– 2-га група, порівняльне дослідження, п'ятиразове введення цисплатину (по 30 мкг), україну (по 75 мкг екстракту чистотілу в об'ємі 0,2 мл);

– 3-тя група, порівняльне дослідження, поєднане або роздільне триразове введення цисплатину (по 30 мкг), україну (по 75 мкг екстракту чистотілу в об'ємі 0,2 мл).

Протипухлинний ефект препаратів оцінювали за динамікою кількості лікованих живих тварин в різні строки після імплантації гліоми 101.8, за загальною тривалістю життя та тривалістю клінічних проявів.

Математична обробка отриманих результатів проведена з використанням пакету програм «Statistica 5.0».

Результати та їх обговорення. За даними дослідження встановлено, що амітозин в тестах *in vitro* справляє цитотоксичний вплив на клітини внутрішньомозкових пухлин ЦНС різного генезу. Прямий протипухлинний ефект препарату залежить від його концентрації. За даними ММТ-тесту амітозин в найбільшій концентрації 1000 мкг/мл після експозиції протягом 1 доби пригнічує активність мітохондрій (цитотоксична дія (ЦД) понад 25 у.о.) усіх клітин злоякісних пухлин ЦНС та справляє цитотоксичний вплив на їх життєздатність (**табл. 1**). За поступового зменшення концентрації препарату до 100 мкг/мл, яка відповідає початковій терапевтичній, ЦД₂₅ на клітини головного мозку різного генезу відзначали у 71,4% спостережень; при концентрації амітозину в культивувальній середовищі 10 мкг/мл — у 46,8%.

При дослідженні імуномодуючої активності амітозину відзначено, що препарат в концентрації 100 мкг не справляє достовірного впливу на експресію активованих молекул CD25 та HLA-DR мононуклеарів периферійної крові умовно здорових донорів. При зменшенні концентрації до 10 мкг/мл експресія CD25 та HLA-DR антигенів мононуклеарами донорів підвищувалась удвічі (**табл. 2**).

При вивченні впливу препарату україн у різних концентраціях (100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл) на експресію активованих молекул мононуклеарів донорів (експозиція протягом 1 доби *in vitro*) не встановлено суттєвих змін експресії HLA-DR антигену і CD25 антигенів (**табл. 3**).

Підвищення експресії CD 95 (рецептору апоптозу) відзначали при використанні україн у дозі 100 мкг. В цій концентрації препарат справляє цитотоксичний вплив на мононуклеари донорів. Ці за даними МТТ тесту становив $(43,68 \pm 18,37)\%$, кількість живих клітин серед

Таблиця 1. Цитотоксичний вплив *in vitro* препарату амітозин на клітини пухлин головного мозку

Показник	Величина показника під впливом препарату в дозі мкг/мл ($M \pm m$)			Контроль
	1000	100	10	
Життєздатність, %* (n=14)	26,26 \pm 14,37 ^v	64,56 \pm 24,21	65,9 \pm 19,9	63,8 \pm 20,88
ЦД# (n=14)	65,38 \pm 21,85	35,51 \pm 21	18,31 \pm 15,8	—
ЦД ₂₅ , %	100	71,4	46,8	—

Примітка. * — за показниками вітального фарбування трипановим синім; # — за показниками МТТ-тесту; ^v — різниця показника достовірна у порівнянні з таким у контролі (P<0,01).

Таблиця 2. Вплив *in vitro* препарату амітозин на експресію активованих молекул мононуклеарів донорів

Показник	Величина показника під впливом препарату в дозі, мкг/мл ($M \pm m$)		Контроль
	100	10	
HLA-DR, % (n=7)	12,67 \pm 1,42	21,5 \pm 2,33*	10,03 \pm 1,78
CD25, % (n=7)	12,1 \pm 1,84	19,3 \pm 0,95*	8,87 \pm 1,34

Примітка. * — різниця показників достовірна у порівнянні з такою у контролі (P<0,05).

Таблиця 3. Вплив препарату україн на експресію активованих молекул мононуклеарів донорів при спільному культивуванні *in vitro*

Показник	Величина показника під впливом препарату в дозі, мкг/мл (M±m)			Контроль
	100	10	1	
HLA-DR (n=6)	15,32±2,83	10,83±2,65	7,35±1,48	11,22±3,94
CD95 (n=6)	19,85±4,84	15,01±5,31	10,23±1,24	13,45±5,49
CD25 (n=6)	15,8±1,6	14,06±5	12,2±1	14,93±7,26

мононуклеарів після експозиції з україн в дозі 100 мкг/мл протягом 1 доби становила (48,0±4,7)%, у контролі — (96,0±0,2)%. Зменшення концентрації препарату в культуральному середовищі супроводжувалось зменшенням ЦІ та збільшенням кількості живих клітин. Так, при застосуванні україн в концентрації 1 мкг/мл ЦІ становив (8,72±6,97)%, життєздатність мононуклеарів — у середньому 90%.

Таким чином, препарати рослинного походження амітозин та україн в тестах *in vitro* дозозалежно впливають на експресію HLA-DR, CD25 і CD95 на периферійних мононуклеарах, а виявлене підвищення експресії HLA-DR та CD25 антигенів при застосуванні амітозину важливе у зв'язку з наявністю порушень в імунній системі при гліомах, зокрема, пригнічення активації лімфоцитів, особливо в системі IL-2, та зменшення кількості мононуклеарів з фенотипом HLA-DR⁺ [20]. Пригнічення експресії HLA-DR у хворих з гліобластомами вважають одним з механізмів формування функціональних порушень Т-лімфоцитів, оскільки антигени головного комплексу гістосумісності HLA класів I і II та коstimуляційні молекули (CD40, CD80/86) відіграють провідну роль в організації міжклітинної кооперації [21].

На наступному етапі досліджували протипухлинний ефект при введенні амітозину, україн в порівнянні з стандартним хіміопрепаратом цисплатином тваринам з експеримен-

тальною гліомою, штамп 101.8. При дослідженні протипухлинного ефекту п'ятиразового введення препаратів чистотілу, починаючи з 8-ї доби (8, 10, 12, 14-та та 16-та доба) після імплантації в мозок клітин гліоми відзначено певну протипухлинну активність амітозину та україн (рис. 1).

Так, на 21-шу добу після імплантації клітин гліоми в групі порівняння (введення розчинників лікарських препаратів) були живі 50% тварин, після введення амітозину тваринам з гліомою 101.8 — 71,4%, україн — 85,6%. На 24-ту добу після внутрішньомозкової імплантації клітин пухлини в групі порівняння всі тварини загинули, при введенні амітозину та україн кількість живих тварин становила відповідно 42,8 і 57,1%. Всі тварини, яким вводили амітозин, загинули на 26-ту добу, україн — на 27-му добу після імплантації клітин гліоми, що в середньому на 2–3 доби більше, ніж в групі порівняння.

В другій серії експериментів п'ятиразове введення україн в більш ранні строки після імплантації клітин гліоми (3, 5, 7, 9-та, 11-та доба) сприяло більш пізній загибелі тварин до (24,5±3,78) доби, тобто, збільшенню тривалості життя тварин з гліомою на 7–10 дів (рис. 2), що достовірно більше, ніж у контрольній групі. Введення цисплатину в ці самі строки забезпечило подовження тривалості життя тварин до (20,1±3,1) доби, що достовірно відрізнялось від такої у контрольній групі, проте, не відрізнялось

від показника в групі тварин, яким вводили україн.

Таким чином, застосування україн сприяло подовженню тривалості життя тварин з гліомою мозку майже так само, як і препарату цисплатин.

Вивчення впливу україн та цисплатину за умови їх роздільного та поєднаного введення щурам з гліомою 101.8 свідчило, що триразове введення цисплатину на 5, 7 та 10-ту добу після імплантації клітин пухлин сприяло подовженню тривалості життя щурів з пухлинною головою мозку на 6–8 дів. Тривалість їх

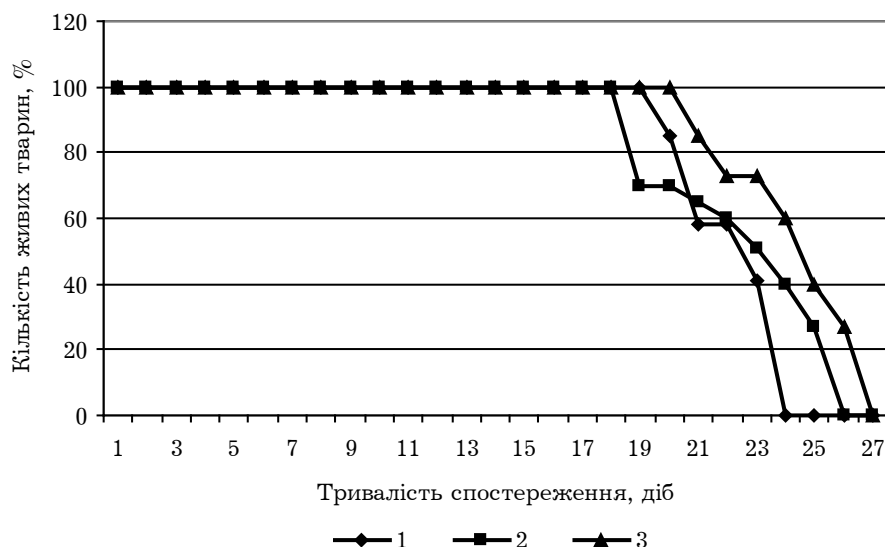


Рис. 1. Динаміка тривалості життя тварин після внутрішньомозкової імплантації клітин гліоми 101.8 та введення препаратів чистотілу на 8, 10, 12, 14-ту та 16-ту добу. 1 — група порівняння (гліома 101.8); 2 — гліома 101.8+амітозин; 3 — гліома 101.8+україн.

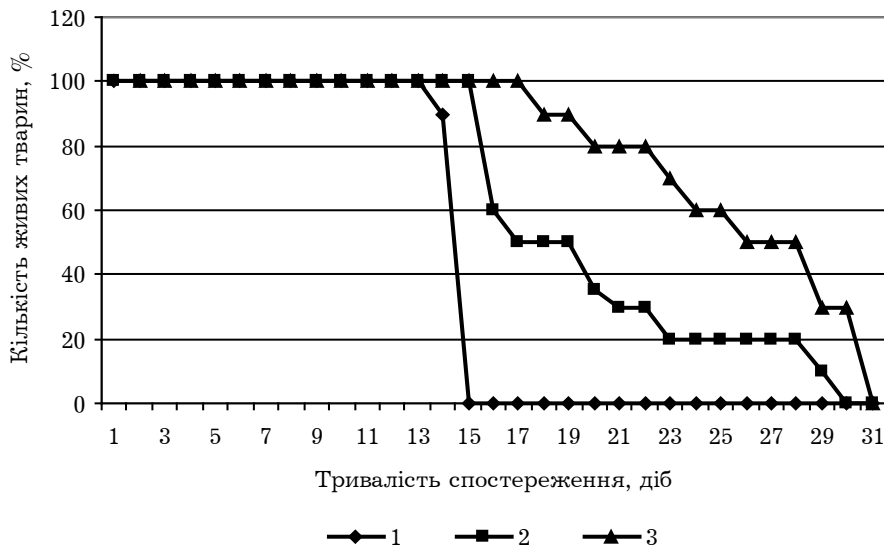


Рис. 2. Динаміка тривалості життя тварин після внутрішньомозкової імплантації клітин гліоми 101.8 та введення україну і цисплатину на 3, 5, 7, 9-ту та 11-ту добу. 1 — група порівняння (гліома 101.8); 2 — гліома 101.8+цисплатин; 3 — гліома 101.8+україн.

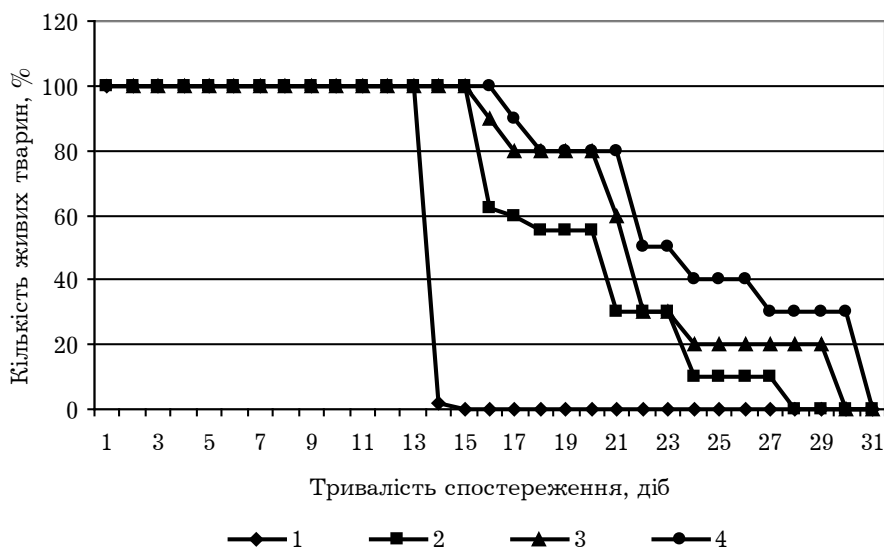


Рис. 3. Динаміка тривалості життя тварин після внутрішньомозкової імплантації клітин гліоми 101.8 та введення цисплатину та україну на 5, 7-му і 9-ту добу. 1 — група порівняння (гліома 101.8); 2 — гліома 101.8+україн і цисплатин; 3 — гліома 101.8+україн; 4 — гліома 101.8+цисплатин.

життя у середньому становила $(20,1 \pm 3,1)$ доби, проте, застосування в ці строки україну було дещо більш ефективним, тривалість життя становила $(22,1 \pm 4,8)$ доби (рис. 3). За поєднаного введення цисплатину та україну вірогідні розбіжності тривалості життя у порівнянні з такою у тварин, яким вводили тільки цисплатин, не спостерігали, проте, ефективність україну дещо зменшувалася, що можна пояснити пригніченням імуностимулюючого впливу україну при застосуванні цисплатину. Оскільки поєднане використання україну і цисплатину сприяло подовженню тривалості життя тварин з пухли-

нами мозку, доцільне їх окреме застосування в різні періоди лікування.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать, що рослинні препарати чистотілу (амітозин та україн) в тестах *in vitro* справляють цитотоксичний вплив на клітини пухлин ЦНС та імуномодельюючий вплив на імунокомпетентні клітини, а також певний протипухлинний вплив при введенні експериментальним тваринам з гліомою 101.8. Ефективність препаратів україну та амітозину залежить від строків їх введення після внутрішньомозкової імплантації клітин гліоми та схеми лікування. Так, використання україну в ранні строки після імплантації клітин гліоми, по-перше, сприяло більшому подовженню тривалості життя тварин з гліомою, ніж при більш пізньому його введенні (на 8-му добу після імплантації клітин штаму 101.8). По-друге, за умови п'ятиразового введення україну, починаючи з 3-ї доби після імплантації клітин гліоми, тривалість виживання тварин була співставна з такою при застосуванні хіміопрепарату цисплатину, досить ефективного при лікуванні пухлин мозку у людини [22]. В той же час, за поєднаного застосування цисплатину та україну у щурів з гліомою 101.8 не спос-

терігали суттєвого збільшення тривалості життя дослідних тварин, що свідчило про доцільність їх окремого або поетапного використання.

У численних дослідженнях *in vitro* встановлено, що україн проявляє протипухлинну дію за наявності пухлин молочної залози, підшлункової залози, слизової оболонки ротової порожнини, первинної пухлини печінки, дрібноклітинного та недрібноклітинного раку легенів, різних видів сарком, лімфоми і меланоми [10, 11]. Протипухлинна та протиметастатична дія україну відзначена також на моделі карциноми

Льюїса [23]. Встановлена нами протипухлинна дія україн у щурів з гліомою мозку обґрунтовує можливість використання цього препарату в нейроонкології.

Висновки. 1. Препарати чистотілу амітозин і україн в тестах *in vitro* дозозалежно впливають на активовані молекули лімфоцитів донорів. Амітозин вдвічі підвищує експресію CD25 та HLA-DR антигенів на лімфоцитах, україн суттєво не впливає на експресію CD25 рецептора лімфоцитами, що свідчить про більшу імуностимулюючу активність амітозину.

3. Застосування амітозину та україн сприяло подовженню життя щурів з експериментальною гліомою, штамп 101.8. Протипухлинний ефект залежить від схем та строків введення препаратів, україн має більш виражену протипухлинну дію.

3. Тривалість життя щурів з гліомою мозку при введенні україн співставна з такою при введенні цисплатину, що свідчить про досить високий протипухлинний вплив україн, проте, застосування україн та цисплатину не забезпечує суттєве подовження тривалості життя тварин з гліомою мозку в порівнянні з такою за роздільного використання цих препаратів.

4. Отримані дані свідчать про доцільність використання цих препаратів в нейроонкології поряд з іншими хіміопрепаратами та імуномодуляторами.

Список літератури

1. Зозуля Ю.П. Нейрогенний імунодефіцит при вогнищевих ураженнях головного мозку та його клінічне значення / Ю.П. Зозуля, М.І. Лісяний // Журн. АМН України. — 1998. — Т.4, №1. — С.44–63.
2. Содержание FcγRIII-положительных клеток в глиомах разной степени злокачественности / Н.И. Лисяный, О.В. Маркова, А.Я. Главацкий, Л.Н. Бельская // Иммунология. — 1999. — №4. — С.56–58.
3. Застосування індукторів інтерферону в комбінованому лікуванні гліом головного мозку / М.І. Лісяний, С.А. Бичкова, І.О. Гнедкова, [та ін.] // Імунологія та алергологія. — 2004. — №1. — С.38–39.
4. Бережная Н.М. Иммунология злокачественного роста / Н.М. Бережная, В.Ф.Чехун. — К.: Наук. Думка, 2005. — 791 с.
5. Завалевич М.П. Остановка клеточного цикла в точке G2/M и индукция апоптоза в злокачественных клетках человека при действии Амитозина *in vitro* / М.П. Завалевич, Н.Н. Храновская, Л.А. Заика [та ін.] // Онкология. — 2004. — Т.6–3, приложение. — С.10.
6. Потапальська Ю.А. Вивчення впливу препарату амітозин на клітини тетрабластоми яєчників людини (клітини лінії РА-1) / Ю.А. Потапальська, Л.Л. Лукаш, О.В. Підпала // Матеріали міжнародного форуму «Основи молекулярно-генетичного оздоровлення людини і довкілля». — К., 2005. — С.170–171.
7. Потапальский А.И. Препараты чистотела в биологии и медицине / А.И. Потапальский. — К.: Наук. думка, 1992. — 240 с.
8. Потапальський А.И. Барбарис и его препараты в биологии и медицине / А.И. Потапальский, Л.И. Петличная, С.В. Ивасивка. — К.: Наук. думка, 1989. — 115 с.
9. Гриневич Ю.А. О влиянии препарата «Амитозин» на противоопухолевую резистентность и иммунную систему организма / Ю.А. Гриневич, С.В. Мартыненко, Н.Н. Храновская, [и др.] // Матеріали міжнародного форуму «Основи молекулярно-генетичного оздоровлення людини і довкілля». — К., 2005. — С.45–47.
10. Jagiello-Wojtowicz E. Ukrain (NSS-63570) in experimental and clinical studies: a review / E. Jagiello-Wojtowicz, Z. Kleinrok, E.M. Urbanska // Drugs Exp. Clin. Res. — 1998. — V.24. — P.213–219.
11. Deneka E.R. Morphometric and kinetic analysis of the growth of experimental sarcoma-45 in the presence of Ukrain / E.R. Deneka // Drugs Exp. Clin. Res. — 1998. — V.24. — P.281–285.
12. Лисяный Н.И. Изучение цитотоксического действия иммуномодуляторов на клетки медуллобластом / Н.И. Лисяный, Л.И. Примушко // Матеріали XI з'їзду онкологів України. — К., 2006. — С.30.
13. Louis D.N. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System / D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler. — Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2007. — 312 p.
14. Иммунологические методы; под ред. Г. Фримель. — М.: Медицина, 1987. — 472 с.
15. Божкова В.П. Руководство по культивированию нервной ткани. Методы. Техника. Проблемы / В.П. Божкова, Л.А. Брежестовский, В.М. Буравлев. — М.: Наука, 1988. — 318 с.
16. Parks D.R. et al. Flow cytometry and fluorescence activated cell sorting (FACS) / Handbook of experimental immunology. — 1986.
17. Шпакова А.Н. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток / А.П. Шпакова, К.С. Павлова, Т.И. Булычева // Клин. лаб. диагностика. — 2000. — №2. — С.20–23.
18. Халанский А.С. Новые перевиваемые глиомы головного мозга крыс / А.С. Халанский, Л.И. Кондакова, А.П. Авцин // Вопр. нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. — 1995. — №2. — С.23–25.
19. Ромоданов С.А. Об эффективности тимостимуляции при комбинированной терапии глиом в эксперименте / С.А. Ромоданов, Н.И. Лисяный, Ю.А. Гриневич // Вопр. нейрохирургии. — 1984. — №1. — С.20–23.
20. Характеристика и механизмы иммунных нарушений у больных со злокачественными опухолями головного мозга / Н.А. Хонина, М.И. Центнер, О.В. Леплина, [и др.] // Вопр. онкологии. — 2002. — Т.48, №2. — С.196–202.
21. Ярилин А.А. Межклеточная кооперация при иммунном ответе. Выбор клеточной формы ответа / А.А. Ярилин // Иммунология. — 1999. — №1. — С.17–24.
22. Зозуля Ю.А. Современная технология консервативного лечения глиом / Ю.А. Зозуля, И.Г. Васильева, А.Я. Главацкий [и др.] // Глиомы головного мозга. — К.: ЕксОб, 2007 — С.383–569.
23. Противоопухолевое и иммуномодулирующее действие препарата на основе тиофосфорных производных чистотела большого / С.А. Шалимов, Ю.А. Гриневич, С.В. Мартыненко, Н.Н. Храновская // Эксперим. онкология. — 2001. — №23. — С.282–286.

Лісяний М.І., Бельська Л.М., Ключникова А.І.

Імуномодулююча і протипухлинна дія препаратів чистотілу на пухлини головного мозку

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, м. Київ

У тестах *in vitro* доведений дозозалежний вплив препаратів чистотілу (амітозину і україну) на активовані молекули лімфоцитів (CD25, CD95) і HLA-DR антиген. На моделі експериментальної злоякісної гліоми мозку щура (штам 101.8) вивчена протипухлинна активність препаратів чистотілу, протипухлинний ефект залежить від схеми і строків введення препаратів. Україн, як і цисплатин, збільшує тривалість життя тварин з експериментальною гліомою.

Ключові слова: експериментальна злоякісна гліома, протипухлинна та імуномодулююча активність, препарати чистотілу.

Лисяний Н.И., Бельская Л.Н., Ключникова А.И.

Иммуномодулирующее и противоопухолевое действие препаратов чистотела на опухоли головного мозга

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

В тестах *in vitro* доказано дозозависимое влияние препаратов чистотела (амитозина и украин) на активированные молекулы лимфоцитов (CD25, CD95) и HLA-DR антиген. На модели экспериментальной злокачественной глиомы мозга крысы (штамм 101.8) изучена противоопухолевая активность препаратов чистотела, противоопухолевый эффект зависит от схемы и сроков введения препаратов. Украин, как и цисплатин, увеличивает продолжительность жизни животных с экспериментальной глиомой.

Ключевые слова: экспериментальная злокачественная глиома, противоопухолевая и иммуномодулирующая активность, препараты чистотела.

Lisyanii N.I., Behlskaya L.N., Klyuchnikova A.I.

Immunomodulative and antitumor effect of celandine's preparations on brain tumors

Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev

Doze-dependent effect of celandine's preparations (amytozin and ukrain) on activated lymphocyte molecules (CD25, CD95) and HLA-DR antigen *in vitro* was shown. Antitumor activity of celandine's preparations was studied on the model of experimental glioma in rats (stamm 101.8), the antitumor effect depended on scheme and terms of preparations' introduction. Ukrain, as well as cisplatin, increased survival terms of animals with experimental glioma.

Key words: experimental malignant glioma, antitumor and immunomodulative activity, preparations of celandine.

Коментарій

к статті Лисяного Н.И. і соавторів «Іммуномодулююче і противоопухолеве действие препаратів чистотела опухли головного мозга»

Представлена робота посвящена експериментальному обґрунтуванню можливості застосування в нейроонкології препаратів — производних чистотела — амітозину і україну, які широко застосовують в комплексному лікуванні пацієнтів з онкологічними захворюваннями, оскільки вони мають не тільки противоопухолевими, але і імуномодулюючими властивостями.

В короткому огляді літератури автори справедливо відзначають, що впровадження в нейроонкологію цих противоопухолевих препаратів може бути одним з шляхів підвищення ефективності лікування опухоль мозку, оскільки при високій противоопухолевої активності вони малотоксичні і здатні відновлювати активність імунних реакцій в організмі хворого.

Розробка цього питання має надзвичайно важке практичне значення для лікування пацієнтів з нейроонкологічними захворюваннями, у яких ріст злоякісних опухоль в мозку супроводжується суттєвими порушеннями в системі імунітету. Уместно підкреслити, що для нейроонкології подібний аспект досліджень є новим і перспективним напрямком.

В статті представлені результати експериментальних досліджень цитотоксичної активності амітозину в відношенні гліом головного мозку людини на моделях *in vitro* (на суспензійних культурах), а в експериментах *in vivo* — на перевивній злоякісній гліомі мозку щурів (штам 101.8) — амітозину і україну в порівнянні з цисплатином. Наряду з цим, вивчено

влияние этих препаратов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток периферической крови (мононуклеаров) условно здоровых людей.

При оценке характера прямого цитотоксического действия амитозина на жизнеспособность клеток 14 злокачественных глиом мозга человека в краткосрочных культурах (*in vitro*) авторы установили дозозависимое увеличение количества поврежденных клеток опухоли (по показателю цитотоксического индекса), что совпадает с результатами тестирования цитотоксичности амитозина в количественном МТТ-тесте. В этом тесте выраженность цитотоксического эффекта амитозина также дозозависима и увеличивается пропорционально при воздействии на клетки опухоли более высоких концентраций препарата. Так, при тестировании наибольшей концентрации амитозина 1000 мкг/мл, в 10 раз превышающей условно терапевтическую (100 мкг/мл), отмечено снижение активности митохондрий клеток опухоли в 100% исследованных глиом мозга человека. В связи с этим в дальнейшем при накоплении большего количества материала рекомендовано проанализировать выраженность достигнутого противоопухолевого эффекта амитозина в зависимости от исходной гистоструктуры глиом и степени их злокачественности.

К сожалению, в этом разделе работы не приведены результаты тестирования укрaina на жизнеспособность клеток в суспензионных культурах глиом человека, поэтому не представляется возможной сравнительная оценка их прямого цитотоксического влияния на клетки глиом человека в этих экспериментах.

Большой интерес представляют полученные данные в отношении ответной реакции на воздействие разных концентраций амитозина и укрaina на иммунокомпетентные клетки, выделенные из крови условно здоровых людей. Оценка этих реакций проведена на современном молекулярном уровне по показателям экспрессии активированных молекул на поверхности мононуклеаров после экспозиции клеток в течение 1 сут с тестируемыми препаратами. Результаты исследования сопоставляли с величиной цитотоксического индекса по данным МТТ-теста. Однако диапазон определяемых показателей (молекул) в этих опытах (табл. 2 и 3) для амитозина и укрaina не однотипный: при исследовании амитозина не определяли экспрессию CD95.

Вполне обоснована постановка последующих экспериментов по тестированию активности амитозина и укрaina *in vivo* на модели перевивной злокачественной глиомы мозга крыс (штамм 101.8). С этой целью авторы использовали различные схемы применения у живот-

ных амитозина и укрaina, касающиеся сроков начала лечения и частоты введения препаратов, а также их отдельного и сочетанного с цисплатином введения. В качестве критериев эффективности противоопухолевого влияния препаратов на рост глиомы авторы использовали показатели продолжительности жизни и динамику клинических проявлений заболевания в группах «леченых» и контрольных животных. Результаты этих экспериментов позволили сделать ряд важных практических выводов, которые могут оказаться полезными в дальнейшем для разработки режимов применения амитозина и укрaina в клинических условиях.

Прежде всего, это касается увеличения показателей выживания животных, у которых применяли амитозин и укрaina, на 2–3 сут по сравнению с таковыми в контрольной группе. Особый интерес представляет также вывод о большей эффективности укрaina после более раннего начала его применения у животных с глиомой мозга, что проявлялось более существенным увеличением продолжительности их жизни — на 7–10 сут, что сопоставимо с влиянием цисплатина. Вместе с тем, по наблюдениям авторов сочетанное применение у животных с глиомой укрaina и цисплатина существенно не влияет на продолжительность их жизни, что свидетельствует о нецелесообразности применения такого сочетания и должно быть учтено в дальнейшем. В связи с этим, на наш взгляд, важно было бы проследить эффективность сочетанного применения амитозина и цисплатина, что может стать предметом последующих исследований.

Целесообразно порекомендовать авторам продолжить и углубить исследования в данном направлении и использовать возможность сравнительных исследований лечебного патоморфоза в ткани глиомы мозга крыс после применения амитозина и укрaina. Рекомендуются также изучить противоопухолевую активность этих препаратов на модели тканевых культур глиом мозга человека с анализом их чувствительности в зависимости от гистоструктуры и степени злокачественности.

Таким образом, представленная статья имеет несомненную научную новизну и практическую ценность, основана на исследовании достаточно большого фактического материала. Работа имеет весомые перспективы для дальнейшего углубленного изучения этого нового для нейроонкологии научного направления, результаты которого имеют как практическое, так и теоретическое значение и должны быть учтены при совершенствовании тактики комплексного лечения пациентов с нейроонкологическими заболеваниями.

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