

И.И. Сакович, .С. Федулов, .Б. Квачева, .П. Веевник, И.В. Пыко

Использование культур опухолевых клеток ЦНС для изучения механизмов противоопухолевой активности Темозоломида, иммобилизованного на высокозамещенном фосфате декстрана (доклиническое исследование)

Белорусский государственный медицинский университет УЗ «9-я ГКБ», г.Минск

Первично-мозговые и метастатические опухоли головного мозга (ОГМ) составляют 4,6-14,0 случаев на 100000 населения. При этом, коэффициент смертности при них достигает 10,82:100000 населения (второе место из причин смерти при патологии ЦНС после черепно-мозговой травмы) [2,3,4,6,7].

Анатомо-физиологические особенности головного мозга препятствуют достижению успеха в лечении ОГМ даже в комплексе с радио-и химиотерапией. Этому есть несколько причин: ОГМ, в первую очередь, метастатическое поражение головного мозга в большинстве случаев сопровождается выраженным отеком, ограничивающим проведение радикального удаления и снижающим результативность последующей радио/химиотерапии; повреждение опухолевым процессом функционирования гематоэнцефалического барьера ослабляет воздействие туморотропного препарата на опухолевую ткань [9,11,12,13,14].

Одним из ведущих компонентов современных стандартов лечения ОГМ является курсовое применение темозоломида (Temodar®) [1,4]. Но, как показывает практика, значимого удлинения продолжительности жизни больных данной патологией, стабилизации опухолевого процесса и выживаемости до настоящего времени не отмечается. Именно отсутствие способов и методов адекватного локального контроля над опухолевым процессом приводит к неблагоприятному исходу заболевания. Необходима разработка новых технологий комбинированной терапии опухолей с использованием эффективных цитостатиков в максимально допустимых концентрациях химиопрепарата в ходе хирургического вмешательства, в том числе, локальных форм фармпрепаратов.

В практике нейроонкологии США (USA FDA approved) в качестве препарата локального действия стандартно используется (4 фаза клинических испытаний) препарат Глиадел (Gliadel(R) Wafer). Пластинки Глиадела представлены полиферпросаном 20 с имплантацией кармустина (BCNU, 4-6 мг активного вещества в 1 пластинке). Данный препарат является биodeградирующим, укладывается непосредственно к остаткам опухоли головного мозга как при первичных, так и при рецидивных вариантах течения заболевания. В ложе резецированной ОГМ укладывается до 8 пластинок Глиадела. По мере растворения носителя высвобождается активный химиопрепарат (BCNU), обеспечивая тем самым пролонгированное химиотерапевтическое действие на оставшиеся конгломераты опухолевых клеток.

В течение последних лет некоторыми исследователями также предпринимаются попытки использования для локальной химиотерапии глиом лекарственных форм цитостатических препаратов, депонированных на рассасывающихся полимерах. В частности на базе РНПЦ неврологии и нейрохирургии МЗ РБ проведено изучение методики локальной химиотерапии с использованием в качестве активного вещества цисплатина. Анализ данных комбинированного лечения больных со злокачественными ОГМ с использованием локальной химиотерапии депонированной формой цисплатина свидетельствует, с одной стороны, об эффективности данного метода, а с другой-об отсутствии выраженных токсических проявлений лечения. Полученные результаты показывают эффективность применения комбинированного метода лечения с использованием локальной химиотерапии депонированной формой цисплатина у больных злокачественными новообразованиями головного мозга.

В лаборатории НИИ физико-химических проблем БГУ совместно с РУП «Белмедпрепараты» получен полимер-носитель с высоким содержанием фосфорнокислых групп (высоко-замещенный фосфат декстрана-ВЗФД) и способностью к гелеобразованию (Беляев С.А., и соавт., 2004), который удалось связать с Темозоломидом. Это способствовало созданию новой готовой лекарственной формы на основе активного цитостатика темозоломида – темодекса (ТМ).

Обоснованно предполагая вероятность локального цитостатического действия темозоломида на носителе – фосфате декстрана-на опухолевую линию перевиваемых клеток проведено экспериментальное исследование взаимодействия локальной формы Темозоломида с клетками культуры перевиваемой линии глиомы крысы С-6.

Цель исследования: изучение в культуре перевиваемой линии клеток глиомы крысы С-6 способности к ингибции пролиферативной активности и цитотоксичности новой противоопухолевой лекарственной формы «Темодекс» (Темозоломид иммобилизованный на высокозамещенном фосфате декстрана).

Материал и методы

Препарат: темозоломид, исходная концентрация-3000 мкг/мл. Приготавливали 2-х кратные разведения препарата на полимерном носителе – высокозамещенном фосфате декстрана на питательной среде DMEM:

1500 мкг/мл (№1); 750 мкг/мл (№2); 375 мкг/мл (№3); 187,5 мкг/мл (№4); 93,75 мкг/мл №5), – 46,87 мкг/мл (№6); 23,44 мкг/мл (№7).

Методика получения носителя-фосфорилированного декстрана.

Измельчается декстран, выдерживается в течение 12-16 часов в тетрахлористом углероде (CCl₄). Затем заливается фосфорилирующей смесью, состоящей из фосфорной кислоты (H₃PO₄), трибутилфосфата (Bu₃PO₄) и оксида фосфора (V) (P₂O₅). В зависимости от степени замещения подбирается температура и время проведения реакции. По окончании реакции, образец заливается этиловым спиртом и промывается на приборе Сокслета от кислоты. Затем фосфат декстрана растворяется в воде, доводится рН до значения 7,2-7,4 и лиофильно сушится.

Методика приготовления полимерной формы темозоломида.

Субстанция темозоломида растворяется в рассчитанном количестве воды (исходя из растворимости 3мг препарата в 1 мл воды), в течение суток, фильтруется на стеклянном фильтре. Затем к полученному раствору темозоломида добавляется рассчитанное количество лиофильно-высушенного фосфата декстрана (из расчета на 1 г полимера плюс 30 мл раствора). Набухание проводится в течении 8-12 часов. Затем, полученный препарат фасуется во флаконы и термически стерилизуется. Стерилизация проводится на водяной бане при температуре 96-99 °С в течение 40 минут. На каждую партию препарата получается паспорт стерильности.

Культура клеток: перевиваемая линия клеток глиомы крысы С-6. Получена из коллекции культур клеток института цитологии, Санкт-Петербург. Характеризуется 85-90% содержанием астроглиальных клеток и около 10% олигодендроцитов, которые имеют различную степень зрелости. Культуры выращивали в термостате при 37°C до образования монослоя. В исследованиях использовалась трехсуточная культура.

Посевная доза клеток-150 000 в 1 мл ростовой среды. В качестве ростовой среды использовали питательную среду DMEM (Дульбекко модифицированная среда Игла, Sigma) с добавлением сыворотки плодов коров – 10% (ГУ НИИ ЭМ, МЗ РБ), антибиотиков – гентамицин в дозе 100 мкг/мл. Культуры выращивали как в пластиковых флаконах с ростовой поверхностью 25 см² для изучения накопления клеток в процессе их роста, так и в пробирках с покровным стеклом для приготовления препаратов клеток и проведения морфологических исследований.

Методика проведения эксперимента.

Перед внесением разных доз препарата во флаконах производили смену ростовой среды на питательную среду DMEM без сыворотки, (использовали не менее 3-х флаконов на одну дозу препарата). Через 24 и 48 часов оценивали количество выросших клеток во флаконах (опытных и контрольных). Для этого культуральную среду удаляли, монослой клеток для их диссоциации обрабатывали 0,25% раствором трипсина с 0,025 % раствором версена (1:3). Концентрацию снятых клеток подсчитывали в камере Горяева. Покровные стекла с культурой клеток извлекали из флаконов и фиксировали в 960 спирте в течение 30 минут, окрашивали гематоксилином Бемера в течение 20 мин., промывали водопроводной водой (до появления синей окраски), затем – дистиллированной водой, докрашивали 0,5% водным раствором эозина (30 сек). Для приготовления постоянных препаратов клеток, стекла проводили через батарею спиртов с повышением их концентрации (500, 700, 960, абсолютный спирт) для обезвоживания клеток. После подсыхания препаратов, их просветляли в ксилоле и заключали в канадский бальзам на предметном стекле. Анализ препаратов проводили с использованием светового микроскопа при увеличении 200 – 400 раз. Оценивали целостность монослоя клеток, форму размеры клеток, состояние ядра, цитоплазмы, длину отростков.

Проводили статистическую обработку данных общепринятым методом, определяя достоверность различий по t-критерию Фишера – Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При наблюдении за культурами в течение 24-48 часов их контакта с полимером (высоко замещенный фосфат декстрана) не наблюдалось выраженных морфологических и цитодеструктивных изменений (рис 2, А). Пролиферативная активность клеток культивируемых с полимером сопоставима с таковой в контроле (рис. 1). После 24-часового контакта с разными дозами препарата установлен его ингибирующий эффект в дозах №1-№6 на размножение клеток в культуре. Как видно из представленных на рисунке данных, максимальный эффект ингибирования пролиферации – на 70% снижение накопления клеток по сравнению с контролем – отмечен при дозе 1500 мкг/мл. Минимальный эффект снижения – на 25%-отмечен при дозе 46,9 мкг/мл. Доза препарата № 7 (23,4 мкг/мл) не оказывает достоверного угнетения пролиферативной активности клеток. В эти сроки наблюдения не выявлено выраженной цитотоксичности препарата.

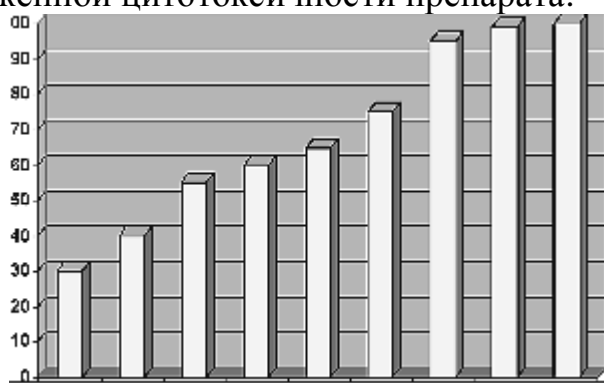
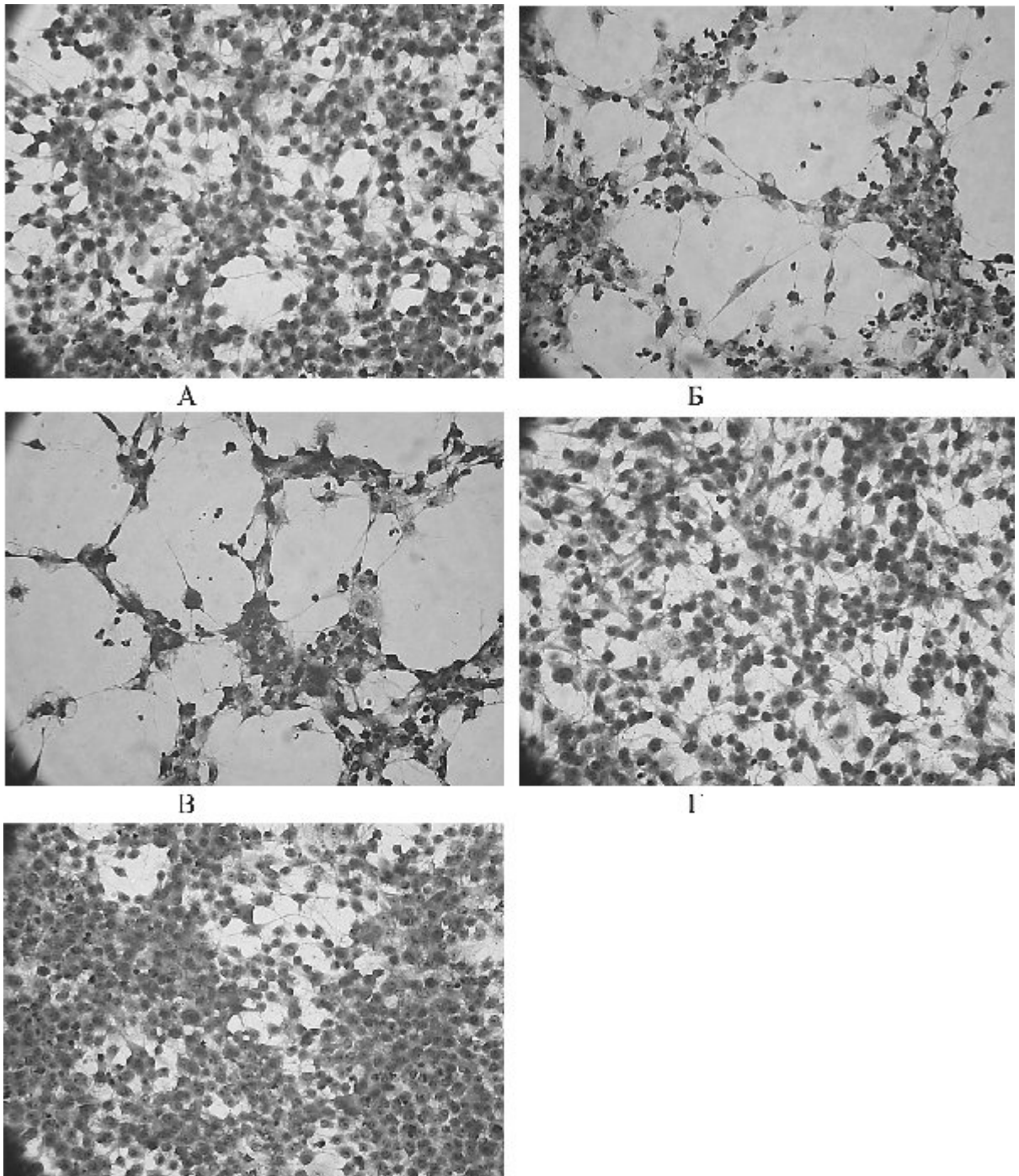


Рис. 1. Пролиферативная активность клеток культивируемых с полимером

Примечание: по оси ординат – процентное содержание клеток в каждой группе по отношению к контролю, по оси абсцисс-дозы препарата



Д

Рис. 2. Пролонгированный дозозависимый цитотоксический эффект препарата ТЗ на полимерном носителе в условиях культуры глиомы крысы С-6 (48 часов воздействия препарата)

А – отсутствие цитотоксического действия полимера на клетки. Б, В – цитодеструктивное действие препарата ТЗ на полимерном носителе в дозах 1500 мкг/мл и 750 мкг/мл соответственно: разрушение монослоя, округление и вакуолизация части клеток, их деструкция, наличие отдельных гипертрофированных клеток, отсутствие митозов, нарушение межклеточных контактов, деструкция отростков клеток; Г-отсутствие выраженной цитотоксичности препарата в дозе 17,188 мкг/мл; Д – интактная культура клеток (контроль). Окраска гематоксилином и эозином. Световая микроскопия.

Увеличение x200.

При учёте результата через 48 часов контакта с разными дозами препарата выявлены морфологические цитодеструктивные изменения в опытных культурах, степень выраженности которых зависела от дозы препарата. Наблюдалось нарушение целостности монослоя, отсутствие митотически делящихся клеток, нарушения межклеточных контактов, укорочение и деструкция отростков клеток, округление части клеток и их деструкция и открепление от поверхности флакона от 50 до 70% клеток (дозы № 1, 2, 3) (рис. 2, Б, В). Часть клеток гипертрофирована, содержала вакуоли, в таких клетках наблюдалась сохранность ядер (3-4 гипертрофированных ядрышка). При обработке клеток препаратом в дозах № 5-7 выраженных морфологических различий с контрольной группой не наблюдалось (рис.2, Г)

Непосредственно к химиотерапевтическим препаратам предъявляются достаточно жесткие требования: способность преодолевать гематоэнцефалический барьер, низкая связываемость с белками крови, поддержание адекватной терапевтической концентрации в тканях головного мозга, низкая нейротоксичность. В настоящее время ни один из существующих препаратов не соответствует этим требованиям [4].

Темозоломид-противоопухолевый химиопрепарат, который изготовлен в 1984 г. в Великобритании [13] и прошел почти 20-летний путь изучения в экспериментальных и клинических условиях. Тщательное и всестороннее исследование препарата позволило выявить его несомненные преимущества перед другими существующими химиотерапевтическими препаратами. ТЗ относится к группе алкилирующих агентов 2-го поколения — имидазотетразинов. После приема внутрь быстро всасывается и поступает в кровотоки в неизменном виде. Являясь небольшой по размерам липофильной молекулой, ТЗ легко проникает через гематоэнцефалический барьер и накапливается в тканях опухоли в концентрациях, достаточных для реализации его противоопухолевой активности.[14] Это особенно важно при лечении опухолей ЦНС. При попадании в организм человека он подвергается спонтанному гидролизу (без участия каких-либо ферментных систем), превращаясь в активный метаболит МТТС, а затем — в реактивный ион метилдиазониум. Именно метилдиазониум и повреждает опухолевые клетки за счет наличия в нем метильной группы. Основным механизмом действия препарата — метилирование ДНК опухолевых клеток — химический процесс присоединения метильных групп (углеводородных остатков) СН₃ к определенным участкам ДНК, нарушающий ее структуру. В конечном итоге это приводит к многочисленным разрывам цепочки ДНК, которые клеточная система репарации восстановить не способна, так как ее также подавляет ТЗ. Доказана эффективность препарата в лечении пациентов и с рецидивами злокачественных глиом. Исходя из вышеизложенного, с целью комбинированного лечения глиом и учитывая мировой опыт в этом направлении нами предпринята разработка и проведено доклиническое изучение новой лекарственной формы для локального применения — «Темодекса».

Выводы

1. Полимер является инертным материалом, не влияющим на морфологию и пролиферативную активность клеток глиомы крысы в культуре;
2. Выявлен пролонгированный дозозависимый цитотоксический эффект ТЗ на полимерном носителе в течении 24 часов на глиальные клетки в культуре С-6, выражающийся ингибированием пролиферации клеток (дозы: 375 мкг/мл, 137,5 мкг/мл) и цитодеструктивным действием препарата (дозы 1500 мкг/мл, 750 мкг/мл).

Литература

1. Коновалов А.Н., Потапов А.А., Лошаков В.А. и соавт. //Стандарты, рекомендации и опции в лечении глиальных опухолей головного мозга у взрослых, Ассоциация нейрохирургов России,-Москва,-2005 г,-31 стр].
2. Улитин А. Ю., Олюшин В. Е., Поляков И. В. //Эпидемиология первичных опухолей головного мозга в Санкт-Петербурге//№1.-2005.-стр 6-10.
3. American Cancer Society.: Cancer Facts and Figures 2006.-Atlanta, Ga: American Cancer Society,-2006. Also available online. Last accessed February 14, 2006
4. Behin A. Primary brain tumours in adults. Lancet Seminar 2003 361: 323-31
5. Goodell TT; Muller PJ//Photodynamic therapy: a novel treatment for primary brain malignancy.J.Neuroscience Nur., 2001, 33(6):296-300
6. CBTRUS: Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States,-1995 – 1999. (<http://www.cbtrus.org/reports//2002/2002report.pdf>) [Accessed 19 October 2005]
7. Legler JM, Gloeckler Ries LA, Smith MA, et al. Brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. J Natl Cancer Inst 1999; 91: 2050A – 51
8. LaRocca R, Glisson S, Hargis J, et al: High-grade glioma treated with surgery; carmustine wafer; postoperative radiation; and procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy. Neurosurgery Quarterly 15:167 – 171, 2005
9. Laws ER, Parney IF, Huang W, et al.// Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. J Neurosurg 99:467 – 473, 2003
10. Popovic EA ; Kaye AH ; Hill JS et al.//Photodynamic therapy of brain tumors. Semin Surg Oncol. 1995; 11(5):335-45