

УДК 616.831-006

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПОДБОРА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

© В.Е. Олюшин, А.А. Петров, М.В. Филатов, А.Ю. Улитин, Ван Юньпэн, В.Ю. Чиркин

Olyushin V.E., Petrov A.A., Filatov M.V., Ulitin A.Yu., Yunpen Van, Chirkin V.Yu. The results of clinical application of the methods of individual selection of cytotoxic medicine for chemotherapy in the process of treating brain malignant tumors. The purpose of research is to studying chemical sensitiveness of malignant brain gliomas in cytotoxic test for individual medicine selection *in vitro*. Variability of glioma cells sensitiveness to direct exposure of different chemical agents is established, what determines the necessity of its determination before beginning chemotherapy in each individual case.

ВВЕДЕНИЕ

Глиальные опухоли головного мозга составляют 50–60 % всех опухолей центральной нервной системы. Заболеваемость злокачественными глиомами составляет 5–8 случаев на 100 тысяч населения. Средняя продолжительность жизни пациентов с глиобластомой редко превышает 12 месяцев, 5-летняя выживаемость составляет 2,5–5,5 % [1, 2].

Инфильтративный характер роста злокачественных глиом не позволяет радикально удалить новообразование при хирургическом вмешательстве. Поэтому наряду с хирургическим лечением важнейшим компонентом терапии больных злокачественными глиомами является лучевая терапия и химиотерапия.

Общей идеей химиотерапевтического воздействия является уничтожение злокачественных опухолевых клеток с возможно меньшим повреждением здоровых тканей. Однако эффективность химиотерапии часто снижается из-за химиорезистентности опухолевых клеток к применяемым цитостатическим препаратам.

Чувствительность к цитостатическим препаратам злокачественных опухолей головного мозга различных гистотипов существенно различается. Даже среди опухолей одинакового гистологического строения в связи с выраженной гетерогенностью клеточной популяции чувствительность к цитостатическим препаратам различна [3, 4].

Согласно данным экспериментальных и клинических исследований, химиорезистентность опухолей может формироваться как к отдельным цитостатическим препаратам, так и к нескольким, что связано с изменением генетического аппарата опухолевых клеток [5].

Феномен резистентности к химиопрепаратам является мультифакторным и включает:

- 1) изменение транспорта препарата через плазматическую мембрану, которые приводят к уменьшению накопления цитостатика в клетке;
- 2) повышенную активность детоксицирующих систем глутатиона и металлотионеина;

- 3) усиленную репарацию ДНК;

- 4) изменение уровня экспрессии онкогенов и генных супрессоров и др. [6, 7].

В частности, чувствительность глиальных опухолей к химиотерапии связана с модуляцией O_6 – метилгуанин – ДНК – метилтрансфераза (MGMT) и глутатиона. Генрепарации ДНК O_6 – метилгуанин – ДНК – метилтрансфераза (MGMT) – суицидный акцепторный белок, удаляющий алкильную группу в O_6 позиции гуанина, алкилированную канцерогенными нитрозосоединениями. По степени экспрессии MGMT, опухолевые клетки разделяют на две группы: Me^+ и Me^- , Me^+ чувствительны к алкилирующему препаратом, Me^- нечувствительны. Основной механизм действия алкилирующих препаратов – метилирование ДНК, обеспечивающее противоопухолевый повреждающий эффект и гибель опухолевых клеток. Однако из-за активности ряда ферментов, ответственных за репарацию ДНК – MGMT, опухоли обладают резистентностью к химическим агентам [4, 8].

Адьювантная химиотерапия, как составная часть комбинированного лечения злокачественных опухолей головного мозга человека, привлекает все большее внимание исследователей [9].

Однако господствующий в этой области эмпирический подход не принес пока желаемых результатов. Это заставило исследователей заниматься разработкой рациональных режимов химиотерапии, основанных на знании параметров клеточных циклов в опухоли, механизма действия и фармакодинамики планируемого препарата. Одним из слагаемых рациональной химиотерапии может явиться подбор препаратов на основании определения индивидуальной чувствительности опухолей *in vitro* до начала лечения. Подобная тактика была с успехом апробирована при лечении лейкозов ещё в 1968 году [10, 11] и некоторых солидных опухолях [12–14].

Также поиски систем для определения индивидуальной чувствительности к химиопрепаратам предпринимались и в нейроонкологии [15–19].

Такое положение дел определяет стремление проводить поиск новых эффективных цитостатических препаратов наряду с использованием рациональных способов определения индивидуальной чувствительности к ним.

Нами накоплен некоторый опыт проведения химиотерапии с индивидуальным подбором цитостатического препарата при лечении злокачественных опухолей головного мозга. В настоящее время проводится оценка эффективности этой терапии.

Цель исследования: изучить эффективность индивидуального подбора цитотоксического препарата для химиотерапии при лечении злокачественных опухолей головного мозга.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вышеуказанным способом в ФГУ РНХИ им. проф. А.Л. Поленова в отделении опухолей головного и спинного мозга за период с ноября 2004 г. по октябрь 2006 г. нами пролечено 10 больных: 4 (40 %) женщины и 6 (60 %) мужчин в возрасте от 30 до 50 лет (средний возраст $49,7 \pm 1,92$ лет). Больные были в компенсированном состоянии по шкале Карновского (80 баллов). Всем пациентам было выполнено оперативное лечение в объеме субтотального удаления опухоли. Гистологически у 7 (70 %) пациентов была выявлена мультиформная глиобластома (GM), у 3 (30 %) - анапластическая астроцитома (AA).

В послеоперационном периоде всем больным была проведена лучевая терапия, по окончании которой проведен курс химиотерапии с учетом индивидуального подбора цитостатического препарата. В случаях отсутствия чувствительности к цитостатическим препаратам проводилась химиотерапия темозоломидом. Курс химиотерапии повторяли каждые 4–6 недель.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Способ осуществлялся следующим образом: материал, полученный из различных участков новообразования в процессе хирургической операции, диспергировали на клеточные составляющие путем стандартно принятой процедуры получения клеточных культур, использующей механическое воздействие в сочетании с ферментативной обработкой трипсином (0,2 %) и ЭДТА (0,05 %).

Полученную суспензию клеток высевали в пластиковые флаконы для культивирования клеток, содержащие культуральную среду с добавкой 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Культуральная среда представляет собой равную смесь стандартных сред ДМЕМ и F12, к которым добавлены: инсулин (5 мкг на мл), трансферин (20 мкг на мл), эпидермальный ростовой фактор (0,1 нг на мл), основной фактор роста фибробластов (0,1 нг на мл), путресцин (1 мк/моль), прогестерон (5 мкг на мл), бетамеркаптоэтанол (50 мк/моль).

Клетки культивировали в течение недели, чтобы произошло эффективное прикрепление клеток к поверхности флакона и возникли очаги роста клеток (колонии). Затем среду меняли и клетки выращивали до заполнения флакона.

Полученную культуру выращивали и пересевали несколько раз с тем, чтобы убедиться, что получилась устойчивая перевиваемая культура опухолевых клеток без примеси нормальных клеток.

Полученную культуру рассевали в стандартные 32 луночные планшета для культур клеток по 20–50 тысяч клеток на лунку. Через сутки в среду добавляли тестируемые химиопрепараты в терапевтических концентрациях (1/10 пиковой плазменной концентрации от клинически рекомендованных доз). После определенного времени обработки их удаляли и клетки тщательно промывали питательной средой.

Клеткам после обработки позволяли расти в полной питательной среде в течение 1,5–2 недель. Затем их число в обработанных и необработанных лунках подсчитывали и сопоставляли с числом изначально посеянных клеток. Таким образом, определяют способность данного цитостатического препарата убивать клетки данной опухоли и подавить их размножение.

Если количество клеток не возрастает или уменьшается в обработанных вариантах, в то время как в необработанных устойчиво растет, то считают, что цитостатический препарат эффективен в данной терапевтической концентрации.

Культуры опухолевых клеток обрабатывали цитостатическими препаратами: нидран, темодал, цисплатин, винкрисин, прокарбазин. в терапевтических концентрациях.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате посева у 2 (20 %) исследуемых роста культуры не было. У 8 (80 %) пациентов отмечен устойчивый рост культуры, в том числе выявлен рост 3 (37,5 %) культур анапластической астроцитомы (2(66,7 %) химиочувствительны к винкристину, цисплатину, прокарбазину, 1 (33,3 %) устойчива ко всем препаратам); 5 (62,5 %) культур мультиформной глиобластомы (3 (60 %) химиочувствительны к винкристину, прокарбазину, 1 (20 %) – к темодалу, 1 (20 %) устойчива ко всем препаратам).

На фоне проводимой терапии с учетом индивидуальной чувствительности к химиопрепаратам у 2 (25 %) пациентов с мультиформной глиобластомой через 8 месяцев после оперативного лечения развилась стойкая токсическая миелосупрессия, вследствие чего терапия была приостановлена. В этих случаях отмечена отрицательная динамика: нарастание клинических симптомов, продолженный рост опухоли по данным МРТ головного мозга. В остальных случаях – 6 (75 %) пациентов через 6 и 8 месяцев после операции и комплексного лечения с индивидуальным подбором химиопрепарата продолженного роста опухоли не выявлено. Продолжается наблюдение.

ВЫВОДЫ

Таким образом, индивидуальный подбор цитотоксического препарата для химиотерапии при лечении злокачественных опухолей головного мозга имеет лечебный потенциал, при этом максимальную степень эффективности еще предстоит выяснить, поскольку сроки и количество наблюдений недостаточны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лосев Ю.А. Эпидемиология первичных опухолей головного мозга в сельской местности (на модели Ленинградской области): автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2003.
2. Улитин А.Ю. Эпидемиология первичных опухолей головного мозга среди населения крупного города и пути совершенствования организации медицинской помощи больным с данной патологией (на модели Санкт-Петербурга): автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб., 1997.
3. Golub T.R. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring // *Science*. 1999. V. 286. P. 531-537.
4. Scherf U., Ross T., Waltham M. et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer // *Nat genet*. 2000. V. 24. P. 236-244.
5. Iwade Y., Fujimoto S., Tagawa M. et al. Association of p53 gene mutation with decreased chemosensitivity in human malignant gliomas // *Int j cancer*. 1996. V. 69. P. 236-240.
6. Чухун В.Ф., Шишова Ю.В. Современные взгляды на механизмы формирования ле-карственной устойчивости опухолей // *Онкология*. 2000. Т. 2, № 1. С. 11-15.
7. Васильева Н.Г., Главацкий А.Я., Чопин Н.Г. и соавт. Химиорезистентность глиом головного мозга как результат реализации их генотипа // *Укр. нейрохир. журн*. 2004. № 4. С. 13-19.
8. Van den Bent M. J., Kros J.M., Heimans J.J et al. Response rate and prognostic factors of recurrent oligodendroglioma treated with procarbazine, CCNU and vincristine chemotherapy // *Neurology*. 1998. V. 51. P. 45-1140.
9. Ромоданов А.П., Рудяк К.Э. Современные проблемы диагностики и лечения злокачественных опухолей мозга по данным зарубежной литературы // *Вопр. нейрохир*. 1976. № 6. С. 54-55.
10. Burns P., Armentrout S., Stjernholm R. Prediction of the response of patient with acute nonlymphocytic leukemia to cytosine arabinoside (LNSC-63878) therapy // *Cancer chemoth rep*. 1972. V. 56. P. 521-534.
11. Cline M., Rosenbaum E. Prediction of in vivo cytotoxicity of chemotherapeutic agents by their In Vitro effect on leukocytes from patients with acute leukemia // *Cancer res*. 1968. V. 28. P. 2516-2521.
12. Sky – Peck H. Effects of Chemotherapy on the Incorporation of 3H-Thymidine into DNA of Human Neoplastic Tissue // *Nat cancer inst*. 1971. V. 34. P. 197-203.
13. Wolberg W. The Effect of 5-Fluorouracil on DNA-Thymine Synthesis in Human Tumors // *Cancer res*. 1969. V. 29. P. 2137-2144.
14. Tisman G., Herbert V., Edlis H. Determination of Therapeutic Index of Drugs by In Vitro Sensitivity Test Using Human Host and Tumor Cell Suspensions // *Cancer chemoth rep*. 1973. V. 57. P. 11-19.
15. Аникалне Д.Л., Котельников В.М., Пурыныш И.Ж., Сафронов В.А. Определение индивидуальной чувствительности глиальных опухолей человека к действию химиотерапевтических препаратов // *Вопр. нейрохир*. 1979. № 4. С. 30-36.
16. Крумина Г.А., Аникалне Д.Л., Кукут П.П., Котельников В.М. Результат клинического применения методики индивидуального подбора химиопрепаратов при лечении глиом // *Вопр. нейрохир*. 1980. № 6. С. 7-12.
17. Орлов Ю.А., Семенова В.М., Стайно Л.П. Оценка чувствительности глиальных опухолей головного мозга к воздействию темодала в цитотоксическом тесте // *Укр. нейрохир. журн*. 2004. № 2. С. 50-54.
18. Iwade Y. Promising survival for patients with glioblastoma multiforme treated with individualized chemotherapy based on in vitro drug sensitivity testing // *Brit j cancer*. 2003. V. 89. P. 1896-1900.
19. Iwade Y., Mochizuki S., Fujimoto S. et al. Alteration of CDKN2/p16 in human astrocytic tumors is related with increased susceptibility to antimitabolite anticancer agents // *Int j oncol*. 2000. V. 17. P. 501-505.

Поступила в редакцию 20 августа 2007 г.