

А.А. Вайнсон, В.В. Мещерикова, С.И. Ткачев

РАДИО-ТЕРМОМОДИФИЦИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ПРЕПАРАТОВ ПЛАТИНЫ, ГЕМЗАРА И ТАКСАНОВ ДЛЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

A.A. Wainson, V.V. Mescherikova, S.I. Tkachev

Radio-thermomodifying Effects of Cisplatin, Gemzar and Paclitaxel on Tumor Cells *in vitro*

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Цель: Изучить величины модификации лучевого, гипертермического и термолучевого поражения опухолевых клеток под воздействием одновременно применяемых в ведущих онкологических клиниках химиотерапевтических препаратов – цисплатины, гемзара и паклитакселя.

Материал и методы: Суспензии трансформированных клеток V-79 китайского хомячка и опухолевых клеток линии SCC7 мышей подвергали гамма-облучению и/или кратковременному гипертермическому воздействию (42 или 43 °С, 30 мин) на фоне воздействия одного из препаратов, после чего определяли величину радио-термомодификации по выживаемости (снижению клоногенной способности) клеток или по степени угнетения их роста.

Результаты: Цисплатин в концентрации 1 мкг/мл в среде с клетками линии V-79 сам по себе снизил их выживаемость на 20 %. При этом цисплатин усилил поражение клеток при гамма-облучении с фактором изменения дозы (ФИД) ≈1,4, а в отношении гипертермического воздействия (42 °С, 30 мин, выживаемость клеток после одной гипертермии снижается в 1,14 раза) проявил только аддитивность. Гемзар (3 мкг/мл) сам по себе снижает выживаемость клеток SCC7 примерно на 15 %. При этой концентрации гемзар существенно, в 1,68 раза, усилил лучевое поражение клеток, т.е. из трёх изученных препаратов обладает наиболее выраженным радиомодифицирующим действием. Гипертермия в данных экспериментах усилила воздействие облучения менее чем на 10 % (в 1,07 раза). Усиление гемзаром поражения клеток от облучения с последующей гипертермией достигло величины 1,8. Модифицирующий эффект паклитакселя оценивали на клетках SCC7 по подавлению роста клеточной популяции. Паклитаксель (0,068 мкМ) усилил эффект облучения в 1,3 раза, эффект гипертермии (43 °С, 30 мин) – в 1,1 раза (в то время как само гипертермическое воздействие усилило лучевое поражение клеток по этому критерию в 1,4 раза). При облучении клеток небольшой эффект самого воздействия препарата на клетки реализуется в виде повышения до 1,58 раза усиления их поражения по сравнению с эффектом только облучения.

Заключение: Полученные данные показывают, что при совместном применении лучевой/термолучевой и химиотерапии опухолей эффект поражения злокачественных клеток превышает аддитивный эффект этих воздействий. Наибольшим радиомодифицирующим эффектом обладает гемзар. Вместе с тем остается важным вопрос о безопасности использования данных комбинаций противоопухолевых агентов, что требует изучения их воздействия на нормальные ткани.

Ключевые слова: клетки SCC7 и V-79, гамма-облучение, гипертермическое воздействие, цисплатин, гемзар, паклитаксель

Purpose: To study the modification of radiation, hyperthermic and radio-hyperthermic damage of tumor cells *in vitro* by chemotherapeutic agents – cisplatin, gemzar and paclitaxel.

Material and methods: SCC7 and V-79 cells in suspension were gamma-irradiated or treated with hyperthermia (42 °C, 30 min) in the presence of one of these compounds. The radio- or thermomodifying effects were estimated according to the decrease in cell clonogenicity of suppression of their growth.

Results: Cisplatin, 1 µg/ml, itself decreased V-79 cell survival by 20 %. It increased the effect of gamma-radiation on clonogenicity with dose modification factor (DMF) ≈1.4, and had only additive effect for hyperthermic treatment (42 or 43 °C, 30 min), which itself decreased clonogenicity by 1.14 times. Gemzar (3 µg/ml) was tested on SCC7 cells, itself decreasing cell clonogenicity by 1.15 times. At this concentration gemzar substantially increased radiation damage, decreasing cell clonogenicity by 1.68 times. The DMF of hyperthermic treatment after radiation was only 1.07. The loss of cell clonogenicity in case of irradiation and following hyperthermia was increased by gemzar with DMF 1.8. The modifying effect of paclitaxel was studied also on SCC7 cells, but using suppression of cell growth as an end-point. At the concentration 0,068 µM paclitaxel diminished cell growth by 20 %, increased the effect of radiation with DMF = 1.3 and effect of hyperthermia by 10 %. Hyperthermic treatment (43 °C, 30 min) itself increased the effect of radiation with DMF=1.4. Due to its own effect on the cell growth and modification of radiosensitivity, the outcome of cell irradiation in the presence of paclitaxel was 1.58 times (DMF) larger than the effect of radiation alone.

Conclusion: These data demonstrates that the combined effect of radio-thermoradiotherapy and chemotherapy of tumors exceeds the additive effect of these three modalities. The largest modifying effect is shown by gemzar, and this corresponds to the data of other investigators. It is also essential to estimate the degree of chemotherapeutic radio-thermotreatment's modification for different normal tissues and cells.

Key words: V-79 and SCC7 cells, gamma-radiation, hyperthermia, cisplatin, gemzar, paclitaxel

Введение

В настоящее время при лучевой терапии опухолей, а в РОНЦ им. Н.Н.Блохина МЗ РФ и ряде зарубежных университетских клиник – и при лучевой терапии с последующей гипертермией, – для повышения эффективности воздействия на злокачествен-

ные клетки используются химиотерапевтические препараты, в частности препараты платины, гемцитабин и таксаны. В настоящем исследовании были оценены величины радио- и термомодифицирующего эффектов этих препаратов как дополнительных к самостоятельному эффекту этих препаратов в отно-

Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва. E-mail: wainson@ronc.ru

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia. E-mail: wainson@ronc.ru

шении злокачественных клеток. Для ряда химиотерапевтических препаратов известно, что при их сочетании с ионизирующим излучением эффект поражения клеток чаще всего является аддитивным, но для некоторых эффект превышает аддитивный, т.е. препараты могут рассматриваться как радиосенсибилизаторы [1, 2]. В отличие от совместного действия с облучением, модифицирующее действие химиотерапевтических агентов при использовании гипертермии (повышении температуры до 42–43 °С на 30 мин – 1 ч) экспериментально изучено существенно меньше, хотя и используется в клинике [3–6]. Знание величин радио- и термомодифицирующих эффектов препаратов указанных групп полезно для оптимизации их использования при термолучевой терапии опухолей с позиций получения как наибольшего противоопухолевого эффекта, так и знания степени необходимого снижения подводимой дозы ионизирующего излучения для уменьшения поражения попадающих в зону облучения критических нормальных тканей.

Материал и методы

Работа выполнена с использованием трансформированных клеток V-79 китайского хомячка и клеток плоскоклеточной карциномы линии SCC7 мышей. Клетки культивировали на среде DMEM/F12 или RPMI-1640 с добавлением 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Для облучения клеток использовали гамма-терапевтический аппарат АГАТ-Р с источником ⁶⁰Со. Вследствие распада источника мощность дозы за период проведения работы изменилась с 0,30 Гр/мин в 2013 г. до 0,22 Гр/мин в 2015 г. Гипертермию путем прогрева клеток при 42–43 °С в течение 30 мин проводили в водяных ультратермостатах TW-2. Методы постановки такого рода экспериментов описаны нами ранее [7].

Работу провели со следующими химиотерапевтическими агентами: препараты платины – цисплатин производства РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ (далее – ЦП), гемцитабин – гемзар производства Lilly (далее – ГЗ), таксаны – паклитаксель производства ЛЭНС-ФАРМ (далее – ПТ).

Использовали несколько вариантов оценки поражения клеток при действии указанных факторов. При оценке воздействия ЦП оценивали снижение клоногенной способности клеток V-79, при оценке воздействия ГЗ – клеток SCC7. Клетки облучали и/или прогревали в виде суспензии, содержащей около 0,5 млн клеток/мл, используя пробирки Эппендорф. Химиотерапевтические препараты вводили в суспензию до начала облучения/прогрева. Через 15 мин – 1,5 ч после завершения облучения суспензию клеток разводили питательной средой до 200 – 40 клеток/мл (в зависимости от используемой дозы излучения), что

приводило к соответствующему снижению концентрации препарата. Полученные суспензии далее разливали по 5 мл по чашкам Петри диаметром 60 мм; выросшие колонии подсчитывали на 8–10-е сутки.

При оценке воздействия ПТ использовали критерий угнетения роста клеток SCC7. Суспензию клеток (2000 клеток в 0,2 мл среды) с добавленным в неё ПТ в разных концентрациях рассеивали по лункам 96-луночных планшетов – по одному планшету на каждый вид и дозу воздействия, и спустя 3 ч планшеты подвергали облучению, воздействию гипертермии (планшеты в полиэтиленовых пакетах полностью погружали в ванны ультратермостатов) или последовательному воздействию обоих агентов. После 3–4 сут культивирования в лунки вводили по 20 мкл раствора ресазурина (13 мкг/мл фосфатного буфера), и через 2–5 ч измеряли экстинкцию при 535 и 590 нм на приборе Униплан, по результатам которой оценивали степень конверсии красителя, отражающую метаболическую активность находящихся в лунке клеток, которая, в свою очередь, пропорциональна их количеству (этот тест – аналог широко известного теста МТТ) [8]. Подавление роста клеточной популяции соответствует степени снижения метаболической конверсии ресазурина.

Результаты и обсуждение

Цисплатин (ЦП). Вначале была определена концентрация препарата, которая за избранное время воздействия 3 ч на клетки V-79 приводила бы к небольшому снижению способности к клонообразованию, чтобы при совместном использовании ЦП с облучением и гипертермией комбинированный эффект не приводил к почти полному подавлению выживаемости клеток, что делало бы затруднительным количественную оценку эффекта. Величина CE_{50} (концентрация ЦП, при которой происходит гибель 50 % клеток) при экспозиции в течение 3 ч в разных опытах находилась в пределах 3–5 мкг/мл. Для основных экспериментов была избрана концентрация 1 мкг/мл, при которой клетки инкубировали 1–1,5 ч до и 2–1,5 ч после облучения/гипертермии. При экспозиции в 3 ч ЦП сам по себе снизил выживаемость клеток V-79 на 20 % (рис. 1, кривая ЦП+Обл в точке 0 Гр, т.е. клетки в присутствии ЦП не подвергали никакому дополнительному воздействию). При гамма-облучении клеток ЦП незначительно усилил их поражение, т.е. несколько увеличил наклон кривой ЦП+Обл по сравнению с наклоном кривой для одного облучения (Обл). Фактор изменения дозы (ФИД) облучения, т.е. дозы, приводящей к одинаковому снижению выживаемости клеток при облучении без препарата и в присутствии ЦП в среде, равен ~1,4.

Гипертермическое воздействие при этом проявило только аддитивность по отношению к действию облучения, на что указывает одинаковый наклон кривых ЦП+Обл+ГТ и ЦП+Обл.

В отношении гипертермического воздействия модифицирующий эффект ЦП оказался незначительным, дополнительно снижая выживаемость клеток примерно в 1,14 раза (см. также табл. 1). Заметим, что из-за логарифмической зависимости степени поражения клеток от дозы гамма-облучения сравнительно небольшой эффект воздействия на необлученные клетки ЦП+ГТ (20 % снижение выживаемости от ЦП + 10 % снижение выживаемости от ГТ) при их воздействии вместе с облучением реализуется в виде значительного усиления общего эффекта – при дозе облучения в 12 Гр происходит трёхкратное снижение выживаемости клеток по сравнению с последствиями одного облучения. Сравнение эквивалентных по эффекту доз лучевого воздействия показывает равен-

Таблица 1

Величины фактора изменения дозы (ФИД) кривых выживаемости клеток V-79 после гамма-облучения с ЦП (1 мкг/мл) и последующей гипертермии (42 °С, 30 мин)

	Доза, снижающая выживаемость клеток до 20 % от исходной, Гр	ФИД
Облучение	16	Принято за 1
Облучение+ГТ	14	1,14
ЦП+Облучение	11	1,51
ЦП+Облучение+ГТ	9,5	1,68

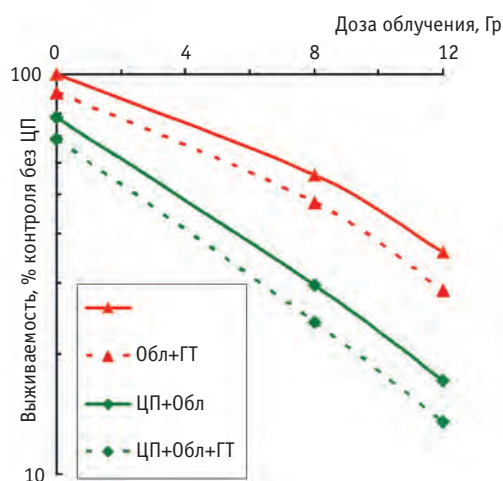


Рис. 1. Выживаемость (способность к клонообразованию) клеток V-79 после гамма-облучения (Обл) на фоне введения в среду цисплатина (ЦП, 1 мкг/мл), облучения с последующей ГТ, а также воздействия ЦП при облучении и гипертермии (42 °С, 30 мин) (ЦП+Обл+ГТ)

ство эффектов при самостоятельном облучении клеток в дозе 12 Гр и при облучении клеток в дозе 4 Гр в среде с ЦП и последующем сеансе гипертермии, т.е. общий модифицирующий эффект по соотношению доз равен 3.

Гемзар (ГЗ). При изучении ГЗ эксперименты проводили на клетках SCC7. ГЗ при использовании в дозе 3 мкг/мл сам по себе снизил выживаемость (клоногенную активность) клеток примерно на 15 % (рис. 2). При этом ГЗ существенно, почти в 1,7 раза, усилил лучевое поражение клеток. Гипертермия в данных экспериментах усилила воздействие облучения в пределах 10 % (в 1,07 раза). Усиление ГЗ поражения клеток от облучения с последующей гипертермией достигло величины 1,75 раза, т.е. этот препарат обладает выраженным радиомодифицирующим эффектом, что коррелирует и с данными ряда других авторов [2] (см. табл. 2).

Таблица 2

Величины фактора изменения дозы (ФИД) кривых выживаемости клеток SCC7 после гамма-облучения с гемзаром (ГЗ, 3 мкг/мл) и последующей гипертермии (42 °С, 30 мин)

	Доза, снижающая выживаемость клеток до 20 % от исходной, Гр	ФИД
Облучение	9,3	Принято за 1
Облучение+ГТ	8,7	1,07
ГЗ+Облучение	5,5	1,68
ГЗ+Облучение+ГТ	5,3	1,75

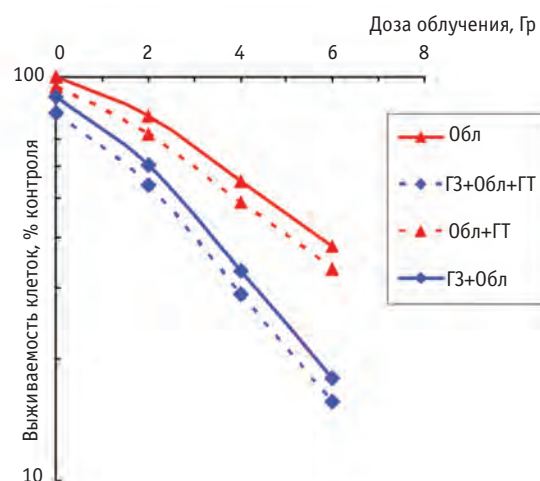


Рис. 2. Выживаемость клеток SCC7 после облучения (Обл), облучения с последующей гипертермией (Обл+ГТ, 42 °С, 30 мин), облучения клеток в среде с гемзаром (ГЗ, 3 мкг/мл, введен за 1 ч до облучения) и Обл+ГТ клеток в среде с ГЗ с последующей ГТ. За 100 % принята эффективность колониеобразования без какого либо воздействия (контроль)

Паклитаксель (ПТ). Результаты изучения модифицирующего воздействия ПТ в восьми концентрациях, от 0,0032 до 0,1 мкМ, на клетки SCC7 представлены на рис. 3 а и б. Степень угнетения роста клеток при действии одного ПТ увеличивается с ростом концентрации в этом диапазоне от 5 до 80 %. В частности, при концентрации 0,0065 мкМ снижение составило 20 %, после чего при дальнейшем повышении концентрации происходит резкое угнетение роста клеточной популяции (рис. 3а, кривая ПТ). На этом рисунке приведены и кривые торможения роста кле-

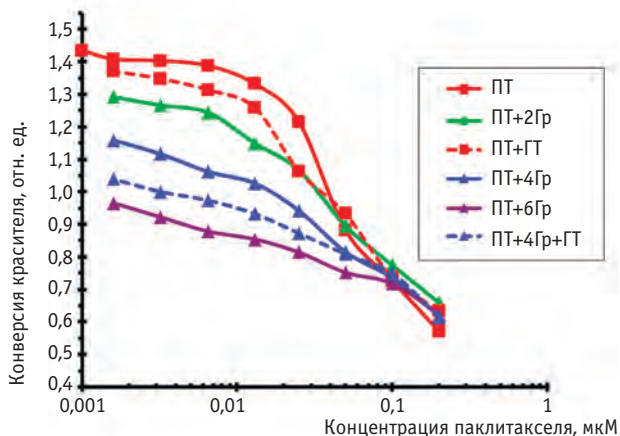


Рис. 3а. Подавление роста клеток SCC7, регистрируемое по более низкой конверсии ресазурина клетками, растущими в лунках планшета), при воздействии паклитакселя (ПТ) в разных концентрациях в среде (контроль, метаболическая активность клеток, растущих без какой-либо обработки – квадрат, соответствующий концентрации ПТ в 0,001 мкМ на оси абсцисс), а также при облучении в дозах 2–6 Гр и облучении в дозе 4 Гр с последующей гипертермией (ГТ, 42 °С, 30 мин) на фоне разных концентраций ПТ в среде

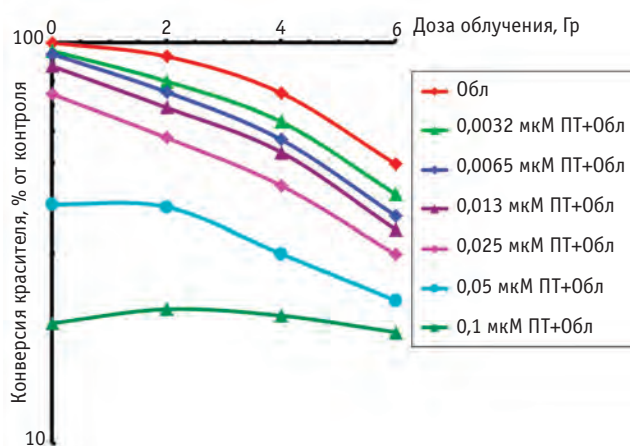


Рис. 3б. Те же данные, что и на рис. 3а, демонстрирующие зависимость радиомодифицирующего действия ПТ в разной концентрации от дозы радиации (на оси абсцисс). Пояснение в тексте

ток при облучении в дозах от 2 до 6 Гр, а также при облучении в дозе 4 Гр с последующей гипертермией, причем все воздействия проведены при восьми концентрациях ПТ в указанном на абсциссе диапазоне доз. На рис. 3б те же данные представлены в виде зависимости подавления роста клеток от дозы облучения при разных концентрациях ПТ. Из рисунка видно, что при низких концентрациях ПТ, до 0,013 мкМ, препарат имеет аддитивный эффект по отношению к облучению, а при более высоких концентрациях ПТ его эффект существенно превалирует над эффектом лучевого воздействия. На рис. 4 представлены данные о подавлении роста клеток при действии ПТ в концентрации 0,0065 мкМ, воздействии гипертермии (ГТ, 43 °С, 30 мин), а также их совместном воздействии; те же данные представлены для случая, когда клетки дополнительно облучили в дозе 4 Гр.

ПТ в данной концентрации усилил угнетение роста клеток облучением в 1,3 раза (сравнение по равноэффективным дозам гамма-облучения – соответственно 6 Гр в отсутствии ПТ и 4,3 Гр при облучении с ПТ), а эффект гипертермии (43 °С, 30 мин) увеличил в 1,1 раза. Интересно, что само гипертермическое воздействие (напомним, что в данных опытах прогрев производили при 43 °С, а не при 42 °С, как в опытах с двумя другими препаратами; кроме того, был использован разный критерий поражения клеток) оказало более выраженный радиомодифицирующий эффект, достигающий по соотношению равноэффективных доз радиации без ГТ и с добавлением ГТ величины в 1,4 раза. Таким образом, ПТ обладает незначительным модифицирующим воздействием при гамма-облучении, и несколько большим модифицирующим действием в отношении облучения с последующей гипертермией.

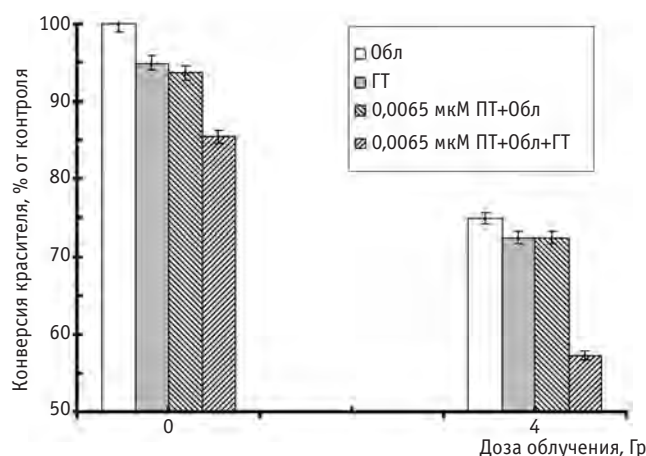


Рис. 4. Снижение конверсии красителя клетками SCC7 в результате воздействия паклитакселя (ПТ, 0,0065 мкМ), гипертермии (ГТ, 43 °С, 30 мин), ГТ с ПТ, а также этих вариантов воздействия при облучении клеток в дозе 4 Гр

Заключение

Полученные данные показывают, что при совместном применении лучевой/термолучевой и химиотерапии опухолей эффект поражения злокачественных клеток превышает аддитивный эффект этих воздействий, и для трёх исследованных препаратов установлена степень этого превышения. Особенно выраженным радиомодифицирующим эффектом обладает гемзар. Вместе с тем, остается важным вопрос безопасности использования комбинаций трёх изучаемых противоопухолевых агентов, что требует определения их воздействия на нормальные ткани и клетки *in vitro*, которое планируется провести с использованием тех же самых методик.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джойнер М.С., ван дер Когель О. Основы клинической радиобиологии. М., «Лаборатория знаний». 2015. 600 с.
2. Hall E. J., Giaccia A.J. Radiobiology for the Radiologist. Seventh Edition. Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins. 2012. 546 pp.
3. Heijkoop S.T., van Doorn H.C., Stalpers L.J. et al. Results of concurrent chemotherapy and hyperthermia in patients with recurrent cervical cancer after previous chemoradiation. // Int. J. Hyperthermia. 2014. Vol. 30. № 1, P. 6–10.
4. Petryk A.A., Giustini A.J., Gottesman R.E. et al. Magnetic nanoparticle hyperthermia enhancement of cisplatin chemotherapy cancer treatment. // Int. J. Hyperthermia. 2013. Vol. 29. № 8. P. 845–851.
5. Schlaich F., Brons S., Haberer T. et al. Comparison of the effects of photon versus carbon ion irradiation when combined with chemotherapy *in vitro*. // Radiat. Oncol. 2013. Vol. 8. P. 260–272.
6. El Shafie R.A., Habermehl D., Rieken S. et al. *In vitro* evaluation of photon and raster-scanned carbon ion radiotherapy in combination with gemcitabine in pancreatic cancer cell lines. // J. Radiat. Res. 2013. Vol. 54 Suppl. 1. P. 113–119.
7. Вайнсон А.А., Мещерикова В.В., Лаврова Ю.Е., Мазохин В.Н. Эффективность облучения и гипертермии при одновременном и последовательном воздействии на опухолевые клетки *in vitro* и перививные опухоли *in vivo*. // Радиация. Биология. Радиозэкология. 2012. Т. 52. № 6. С. 510–516.
8. Вайнсон А.А., Мещерикова В.В. Методика оценки специфической активности генно-инженерных препаратов Г-КСФ, интерферонов α , β и соматотропина *in vitro*. // Российский биотерапевтический журнал. 2012, Т. 11. № 3. С. 29–32.
9. Orth M., Lauber K., Niyazi M. et al. Current concepts in clinical radiation oncology. // Radiat. Environ. Biophys. 2014, Vol. 53, № 1, P. 1–29.
10. Gabikian P., Tyler B.M., Zhang I. et al. Radiosensitization of malignant gliomas following intracranial delivery of paclitaxel biodegradable polymer microspheres. // J. Neurosurg. 2014. Vol. 120. № 5, P. 1078–1085.

Поступила: 05.10.2015

Принята к публикации 12.02.2016