

Експериментальне вивчення протипухлинної дії нової гормональної комбінації на моделі ксенографтів раку передміхурової залози людини

Л.І. ПОЛЯКОВА, О.А. САЛІВОНІК, Л.В. ЧАЙКОВСЬКА, к. біол. н.; О.В. САЧИНСЬКА, к. біол. н.; О.Г. РЕЗНІКОВ, академік НАМН України, д. мед. н., професор

/ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин імені В.П. Комісаренка НАМН України», Київ/

Резюме

Экспериментальное изучение противоопухолевого действия новой гормональной комбинации на модели ксенографтов рака предстательной железы человека

Л.И. Полякова, О.А. Саливоник, Л.В. Чайковская, О.В. Сачинская, А.Г. Резников

В ходе краткосрочных экспериментальных исследований изучено влияние эстрогенного препарата гексестрола, ингибитора 5α -редуктазы стероидов финастерида или их комбинации на рост и гистологическое строение ксенографтов рака предстательной железы человека, трансплантированных под капсулу почки мышей линии СВА. Отдельное применение гексестрола (2 мкг/кг в сутки) или финастерида (5 мг/кг в сутки) на протяжении 3 суток вызывало торможение роста и умеренные деструктивные изменения малигнизированного ацинарного эпителия в ксенографтах. Совместное применение препаратов приводило к значительному усилению противоопухолевых эффектов, в том числе уменьшению эпителиально-стромального соотношения.

Ключевые слова: рак предстательной железы, ксенографт, гексестрол, финастерид

Summary

Experimental Study of Antitumor Effect of a New Hormonal Combination on the Human Prostate Cancer in the Xenograft Model

L.I. Polyakova, O.A. Salivonyk, L.V. Chaikovska, O.V. Sachynska, O.G. Reznikov

In short-term experiments, the effect of estrogenic drug hexestrol, an inhibitor of steroid 5α -reductase finasteride or their combination on growth and histology of the human prostate cancer xenografts implanted under the kidney capsule of CBA mice. A separate administration of hexestrol (2 mg/kg b.w./day) or finasteride (5 mg/kg b.w./day) for 3 days caused growth inhibition and moderate destructive changes in the xenografts. Concomitant use of drugs caused a significant augmentation of antitumor effects, in particular, of the epithelium-stroma ratio.

Key words: prostate cancer, xenograft, hexestrol, finasteride

Проблема лікування раку передміхурової залози (РПЗ) залишається пріоритетною, оскільки ця хвороба займає одне з перших місць у світі серед причин смерті чоловіків від онкологічних захворювань. В Україні за даними канцер-реєстру 2010–2011 рр. було діагностовано 7 тисяч нових випадків РПЗ [6].

РПЗ, який походить з ацинарного епітелію і в переважній більшості випадків характеризується патоморфологами як аденокарцинома, у 80–85% випадків належить до гормонозалежного типу. Тестостерон стимулює прогресування і метастазування РПЗ. Тому основним способом нехірургічного лікування поширеного РПЗ, який діагностується у близько половини хворих, є гормонотерапія антиандрогенними препаратами, що спрямована на досягнення стану андрогенної деривації [7]. Вона є паліативним методом і потребує широкого арсеналу засобів, оскільки зміна препаратів подовжує збереження чутливості пухлини до лікування. Реалізувати повною мірою можливості гормонотерапії можна за рахунок адекватності доз, режимів застосування (способи і строки введення), використання препаратів з різним механізмом

дії, почерговістю їх застосування та комбінованого використання лікарських засобів [4, 14].

Однією з можливих комбінацій є спільне введення інгібітора 5α -редуктази стероїдів фінастериду та синтетичного естрогенного препарату гексестролу. Доцільність використання фінастериду визначається його здатністю послаблювати конверсію тестостерону в активний метаболіт – 5α -дигідротестостерон, а гексестролу – його антигонадотропною активністю у дуже малих дозах і безпосереднім гальмівним впливом на синтез тестостерону в сім'яних залозах.

Попередніми дослідженнями авторів на нормальних щурах і частково – на гетеротрансплантах (ксенографтах) РПЗ людини було показано високу «антипростатичну» ефективність комбінованого застосування фінастериду та гексестролу [5, 8].

Метою даного дослідження було поглиблене вивчення впливу зазначених препаратів на гістологічну будову ксенографтів андрогензалежного РПЗ людини у мишей для характеристики їх протипухлинної активності.

Матеріали та методи дослідження

У дослідженні використано 2 злоякісні пухлини, видалені у хворих 1937 р. та 1964 р. народження під час радикальної простатектомії. Рівень простатоспецифічного антигена (ПСА) у плазмі крові був відповідно 1,3 нг/мл і 9 нг/мл, індекс Глісона – 6 балів. Хворі не отримували попереднього лікування.

Використовували нефросубкапсулярний тест [10, 12], що полягає у гетеротрансплантації фрагментів тканини злоякісної пухлини, в даному випадку – аденокарциноми простати людини, під капсулу нирки мишей лінії СВА та дослідженні гальмування їх росту під впливом речовин, що тестуються. Показником активності препаратів був відсоток гальмування росту ксенографтів відносно контролю при критерії значущості $\geq 25\%$. До підсадки шматочки пухлини зберігали в середовищі 199 з ембріонально телячою сироваткою та антибіотиками при температурі $+4,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ не більше 24 годин. Вихідна маса ксенографтів становила $1,0 \pm 0,01$ мг.

Нестероїдний естрогенний препарат гексестрол у дозі 2 мг/кг або 10 мг/кг маси тіла вводили підшкірно. Фінастерид у дозі 5 мг/кг маси тіла вводили перорально через шлунковий зонд, у вигляді суспензії таблеткової маси в гелі Дорфмана (фізіологічний розчин, що містить 0,5% натрієвої солі карбоксиметилцелюлози, 0,4% твіну-80, 0,9% бензилового спирту). Введення розпочинали з 4-го дня після підсадки ксенографтів і продовжували протягом 3 днів. Контролем були тварини з ксенографтами, які отримували відповідні розчинники. Окремою групою контролю були кастровані тварини з ксенографтами, які також отримували відповідні розчинники.

На 7-му добу після трансплантації тварин миттєво декапітували під легким ефірним наркозом, вилучали ксенографти, зважували їх і розраховували середній приріст маси. Гістологічний аналіз ксенографтів пухлини проводили на серійних парафінових зрізах 4–5 мкм завтовшки, забарвлених гематоксином і еозином [3]. На мікрофотографіях препаратів, забарвлених за методом Малорі, розраховували епітеліально-стромальне співвідношення (ЕСС) за допомогою програми Adobe Photoshop CS3. Пікселі червоного кольору рахували як епітеліальний компонент, а синього – як стромальний компонент. ЕСС вираховували як співвідношення кількості пікселів червоного та синього діапазонів.

Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили за допомогою програм Origin і Excel методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента та непараметричного U-критерію Уїлкоксона–Манна–Уїтні.

Результати та їх обговорення

В контрольній групі на 7-й день після трансплантації маса ксенографтів РПЗ збільшилася в середньому на 79,6%, в той час як у кастрованих тварин – лише на 35%. Достовірне гальмування росту (на 56,0% відносно контролю) свідчило про залежність досліджуваних пухлин від андрогенних гормонів.

Окреме застосування гексестролу в добовій дозі 2 мг/кг або 10 мг/кг, або фінастериду в добовій дозі

5 мг/кг зумовлювало гальмування росту пухлини на 53,5%, 47,2% та 25,9% відповідно порівняно з ростом у контрольних тварин. У групі, яка отримувала комбінацію препаратів (гексестрол 2 мг/кг та фінастерид 5 мг/кг), ріст пухлини гальмувався на 71,1% (таблиця).

Таким чином, гетеротранспланти РПЗ людини за умов перебування під капсулою нирки мишей чутливі до андрогенної депривації та дії кожного з досліджуваних препаратів. При комбінованому застосуванні гексестролу з фінастеридом спостерігали сумарно протипухлинних ефектів.

У зразках аденокарциноми простати людини, з яких брали ксенографти для трансплантації, при гістологічному дослідженні спостерігали розростання малігнізованих епітеліальних клітин у вигляді гетерогенних за формою ацинусоподібних утворень та їх груп, інколи тяжів, що розмежовувалися широкими прошарками строми, в якій нерідко спостерігали лейкоцитарну інфільтрацію (рис. 1, А).

На 7-й день після підсадки та введення відповідних розчинників у ксенографтах контрольної групи спостерігали розростання малігнізованих епітеліальних клітин, що виступали ацинуси у вигляді багат шарового епітелію (рис. 1, Б). В цілому структура первинної пухлини зберігалася. Епітеліальні клітини мали великі світлі ядра, чітке ядерце і невеликий об'єм цитоплазми, набували веретеноподібної форми.

В ксенографтах РПЗ людини, трансплантованих кастрованим мишам, спостерігали значно менше розростання епітелію, ніж у контрольній групі. Це підтверджує, що пухлини є гормонозалежними. В частині ацинусів зберігався неопластичний епітелій, представлений веретеноподібними клітинами з більш гіперхромними ядрами, в яких часто були відсутні ядерця. Частина клітин мала пікнотичні ядра.

Під впливом гексестролу в дозі 2 мг/кг маси тіла відбувалося зменшення розростання епітелію відносно контролю та його розрихлення (рис. 1, В). Епітеліальні клітини мали менші ядра, ядерця часто були відсутні. В частині ядер конденсований хроматин розташовувався під ядерною мембраною, з'являлися пікнотичні ядра. Набряк строми також був більш виражений, ніж у ксенографтах контрольної групи.

У групі тварин, які отримували гексестрол у дозі 10 мг/кг, кількість збережених епітеліальних клітин в ксенографтах була

Таблиця. Вплив гексестролу, фінастериду або їх комбінації на зміну маси ($M \pm m$, мг) ксенографтів раку передміхурової залози людини, трансплантованих під капсулу нирки мишей СВА

Група тварин	Кількість ксенографтів	Маса пухлин		Приріст маси, %	Приріст маси, % від контролю
		початкова	кінцева		
Контроль	19	0,98 \pm 0,01	1,76 \pm 0,11	79,6	100
Кастрація	12	1,00 \pm 0,03	1,35 \pm 0,08*	35,0	44,0
Гексестрол 10 мг/кг	12	1,00 \pm 0,01	1,37 \pm 0,08*	37,0	46,5
Гексестрол 2 мг/кг	12	1,00 \pm 0,00	1,42 \pm 0,08*	42,0	52,8
Фінастерид 5 мг/кг	12	1,00 \pm 0,00	1,59 \pm 0,08*	59,0	74,1
Гексестрол 2 мг/кг + Фінастерид 5 мг/кг	12	1,00 \pm 0,00	1,23 \pm 0,06*	23,0	28,9

Примітка: * – $P < 0,05$.

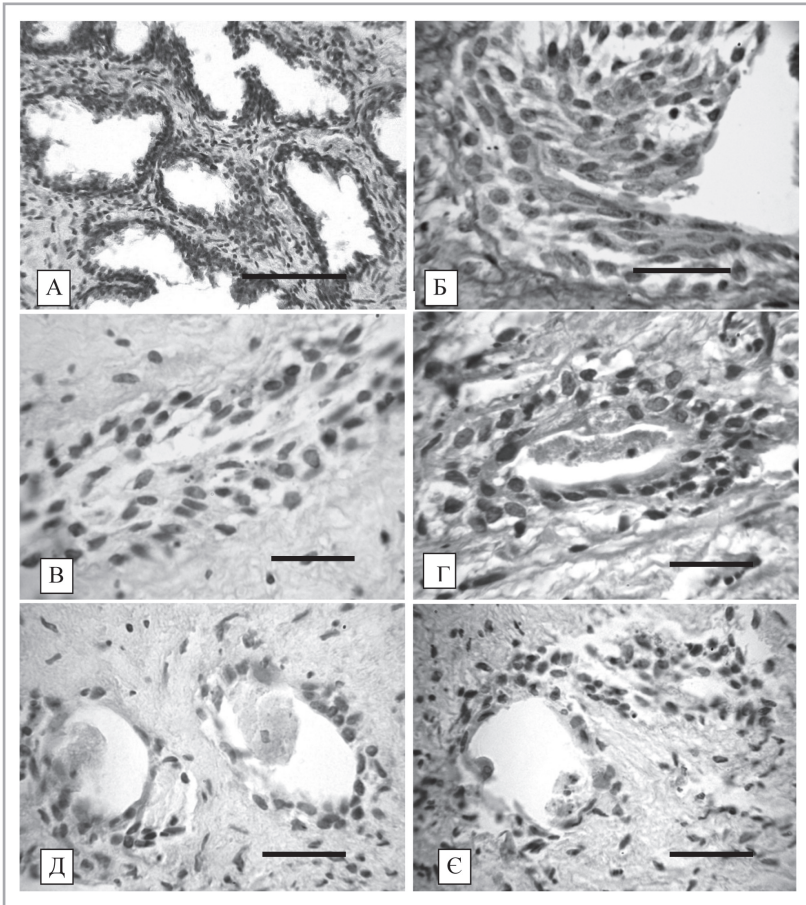


Рис. 1. Вплив гексестролу, фінастериду або їх комбінації на гістологічну будову ксенографтів РПЗ людини. А – вихідна пухлина, Б – контрольний ксенографт РПЗ, багат шаровий малігнізований ацинарний епітелій; В – гексестрол 2 мкг/кг маси тіла, розрихлення епітелію, гіперхромність ядер; Г – гексестрол 10 мкг/кг маси тіла, некроз частини малігнізованих епітеліальних клітин, набряк строми; Д – фінастерид 5 мг/кг маси тіла, стоншення епітеліального шару внаслідок деструктивних змін, детрит у порожнині ацинусів; Е – гексестрол 2 мкг/кг маси тіла та фінастерид 5 мг/кг маси тіла, значна деструкція та апоптоз малігнізованого епітелію, масований пікноз ядер, набряк строми. Гематоксилін-еозин. Масштабний відрізок А – 100 мкм; Б, В, Г, Д, Е – 20 мкм



Рис. 2. Зміна епітеліально-стромального співвідношення в ксенграфтах РПЗ під впливом гексестролу, фінастериду або їх комбінації

значно меншою, ніж у контрольній групі. В порожнині ацинусів знаходили клітинний детрит (рис. 1, Г). Збережені епітеліальні клітини мали ущільнену цитоплазму, гіперхромні, часто пікнотичні ядра. В частині клітин зберігались ядра нормальної будови. Набряк строми був більш вираженим, ніж при застосуванні меншої дози гексестролу.

Застосування фінастериду також сприяло зменшенню розростання епітелію в ксеногратах РПЗ відносно контролю. В ацинусах спостерігали стоншення епітеліального шару та клітинний детрит у порожнинах. В багатьох епітеліальних клітинах під ядерною мембраною знаходили скупчення конденсованого хроматину, що свідчить про апоптотичні зміни в них.

При комбінованому застосуванні гексестролу (2 мкг/кг) та фінастериду у більшій частині ацинусів епітелій був атрофічний, багато клітин мали пікнотичні ядра (рис. 1, Е). В порожнині ацинусів знаходили десквамовані клітини, клітинний детрит і типові апоптотичні тільця. Спостерігали виражений набряк строми. Загалом деструктивні зміни в пухлині було набагато більшими, ніж при окремому застосуванні досліджуваних препаратів.

Розрахунок епітеліально-стромального співвідношення показав, що воно зменшувалося під впливом кастрації або введення гексестролу або фінастериду. Проте найменша відносна кількість епітеліального компоненту визначалась у ксеногратах під впливом комбінації гексестролу (2 мкг/кг) та фінастериду (рис. 2). Звертає на себе увагу, що ЕСС у наших експериментах змінювалося під впливом комбінації гексестролу і фінастериду навіть більше, ніж у кастрованих тварин. Ймовірно, це пояснюється тим, що фінастерид гальмує перетворення тестостерону на дигідротестостерон не тільки тестикулярного походження, але й андрогенів, які надходять у кровообіг з сітчастої зони кори надниркових залоз.

Таким чином, результати гістологічних досліджень узгоджуються з даними щодо гальмування росту ксенографтів РПЗ.

Така комбінація препаратів може розглядатись як одна з форм комбінованої (максимальної) андрогенної блокади, оскільки вона спрямована на зниження рівня тестостерону в крові і перешкоджає перетворенню його на більш активний метаболіт у клітинах-мішенях.

Вважаємо, що результати дослідження мають перспективу клінічного застосування. Андрогенна депривація залишається основним методом лікування РПЗ. Досягти її можна багатьма способами – шляхом орхіектомії та застосування антиандрогенів, застосуванням аналогів рилізінг-гормон лютеїнізуючого гормону (ЛГ-РГ), введенням естрогенів, які є у певному сенсі антигормонами до андрогенів.

Як показали проспективні спостереження, при лікуванні поширеного РПЗ 5-річна виживаність хворих мало відрізняється при застосуванні різних способів андрогенної депривації. На перший план виходять вартість лікування та якість життя. Загальновідомими є тяжкі побічні ефекти, що спостерігаються при використанні естрогенів, зокрема гексестролу, в режимі монотерапії у стандартних дозах (60–100 мг на добу). До них належать гінекомастія, пригнічення ферментів печінки, що призводить до розвитку токсичного гепатиту, дистрофічні зміни в нирках, негативний вплив на серцево-судинну систему, пригнічення імунітету, сексуальної активності [2].

З метою зменшення токсичності естрогенних препаратів автотерапією раніше була запропонована і впроваджена в клінічну онкоурологію схема низькодозової естроген-антиандрогенної терапії з використанням гексестролу та антагоніста андрогенних рецепторів флутаміду [1]. Альтернативною комбінацією, як свідчать результати даного дослідження, є поєднання низьких доз гексестролу з інгібітором 5 α -редуктази андрогенів – фінастеридом, оскільки він є інгібітором 5 α -редуктази стероїдів II типу. Цей ізофермент експресується переважно в органах чоловічої статеві системи, у тому числі в простаті. При його блокуванні зменшення об'єму простати відбувається, в основному, за рахунок регресії ацинарного епітелію, так само, як після кастрації. Фінастерид

забезпечує посткастраційний рівень дигідротестостерону в простаті без зниження рівня тестостерону плазми [9]. Фінастерид застосовують для лікування доброякісної гіперплазії передміхурової залози. Було помічено, що в когорті хворих, які приймали цей препарат із профілактичною метою, була знижена частота захворювань на РПЗ [13]. Інший інгібітор 5 α -редуктази андрогенів – дутастерід – перешкоджає дії андрогенів і викликає загибель клітин раку простати лінії LNCaP [11].

Відомо, що низькі дози гексестролу також забезпечують зниження концентрації тестостерону в плазмі крові. Тому поєднання його з фінастеридом може підвищити ефективність останнього, що й підтверджено результатами даного дослідження.

Висновки

1. На моделі нефросубкапсулярних ксенографтів андрогензалежного РПЗ людини, трансплантованих мишам, отримано докази гальмівного впливу гексестролу та фінастериду на ріст пухлини, зумовлений апоптотичними і деструктивними процесами в малігнізованих епітеліальних клітинах ацинусів.
2. Гістологічні ознаки протипухлинної дії комбінованого застосування гексестролу та фінастериду на ксенографи РПЗ людини більш виражені, ніж при їх окремому застосуванні.

Література

1. Возианов А.Ф., Резников А.Г. Новые направления в гормональной терапии злокачественных опухолей предстательной железы: теоретические и клинические аспекты // Журнал НАМН Украины. – 2000. – Т.6, №3. – С. 451–459.
2. Возианов А.Ф., Резников А.Г., Клименко И.А. Эндокринная терапия рака предстательной железы. – К.: Наукова думка, 1999. – 277 с.
3. Волкова О.В., Елецкий А.В. Основы гистологии и гистологической техники. – М.: Медицина, 1985. – 234 с.
4. Резников А.Г. Оптимальная андрогенная блокада – новое направление в эндокринной терапии больных раком предстательной железы // Онкология. – 1999. – №2. – С. 85–89.
5. Сачинська О.В., Чайковська Л.В., Резніков О.Г. Порівняльна оцінка ефективності комбінованого застосування фінастериду і гексестролу на простату щурів і ксенографи аденокарциноми простати людини // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – №4 (17). – С. 51–55.
6. Федоренко З.П., Гайсенко А.В., Гулак Л.О. та ін. Рак в Україні, 2010–2011 // Бюлетень національного канцер-реєстру в Україні. – №13. – С. 61–64.
7. Хеллерштетт Б.А., Пинта К. Гормональная терапия рака предстательной железы на современном этапе // Онкология. – 2003. – №1. – С. 105–117.
8. Чайковська Л.В., Полякова Л.І., Сачинська О.В., Резніков О.Г. Фінастерид і гексестрол – можлива нова комбінація для лікування раку простати? // Журнал АМН України. – 2007. – Т. 13, №4. – С. 785–794.
9. Bartsch G., Rittmaster R.S., Klocker H. Dihydrotestosterone and the concept of 5 α -reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia // World J. Urol. – 2002. – Vol. 19, №6. – P. 413–425.
10. Bogden A.E., Cobb W.R., Lepage D.J. et al. Chemotherapy responsiveness of human tumours as first transplant generation in the normal mouse: six-day subrenal capsule assay // Cancer. – 1981. – Vol. 48 – P. 10–20.
11. Lazier C.B., Thomas L.N., Douglas R.C. et al. Dutasteride, the dual 5 α -reductase inhibitor, inhibits androgen action and promotes cell death in the LNCaP prostate cancer cell line // Prostate. – 2004. – Vol. 58 – P. 130–144.
12. Richmond A., Su Y. Mouse xenograft models vs GEM models of human cancer therapeutics // Dis. Model Mech. – 2008. – Vol. 1. – P. 78–82.
13. Thompson I.M., Klein E.A., Lippman S.M. et al. Prevention of prostate cancer with finasteride: US/European perspective // Eur. Urology. – 2003. – Vol. 44, №6. – P. 650–655.
14. Vozianov A., Reznikov A., Klimenko I. Androgen deprivation strategy in prostate cancer. Ternopil: Ukrmednynya – Kyiv: Naukova Dumka, 2001. – 240 p.