

# ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА МЕТОТРЕКСАТА НА АСЦИТНУЮ ФОРМУ ТЕРАТОКАРЦИНОМЫ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ

УДК 576.3:602.9  
doi: 10.17816/RCF16332-35

© П.А. Дыбан

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург

Для цитирования: Дыбан П.А. Действие противоопухолевого препарата метотрексата на асцитную форму тератокарциномы и выживаемость мышей // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2018. – Т. 16. – № 3. – С. 32–35. doi: 10.17816/RCF16332-35

Поступила в редакцию 02.08.2018

Принята к печати 14.09.2018

Установлен дозозависимый эффект метотрексата на асцитную форму тератокарциномы СВА9Н6 и мышечных реципиентов, однако различные дозы метотрексата (6, 4 и 2 мкг/г массы тела животного) при многократном введении с интервалом в 48 и 24 ч не уничтожают всю популяцию эмбрионных тел. Так, при трехкратных и даже десятикратных ежедневных инъекциях препарата в дозе 2 мкг/г массы тела в брюшной полости мышей сохраняется  $1,6 \pm 0,2$  и  $0,038 \pm 0,01$  % эмбрионных тел (асцитная форма тератокарци-

номы) соответственно при выживаемости мышей  $93 \pm 8,5$  и  $14 \pm 3,0$  %. Морфологический анализ модуса дифференцировки эмбрионных тел, ретрансплантированных ранее от опытных животных к интактным, показал, что метотрексат не оказал действия на гистобластические потенции стволовых клеток тератокарциномы СВА9Н6.

◆ **Ключевые слова:** действие метотрексата; асцитная форма тератокарциномы СВА9Н6; мыши СВА.

## EFFECT OF THE ANTICANCER DRUG METHOTREXATE ON THE ASCITES FORM OF A TERATOCARCINOMA AND SURVIVAL OF MICE

© P.A. Dyban

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

For citation: Dyban PA. Effect of the anticancer drug methotrexate on the ascites form of a teratocarcinoma and survival of mice. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2018;16(3):32-35. doi: 10.17816/RCF16332-35

Received: 02.08.2018

Accepted: 14.09.2018

The dose-dependent effect of a methotrexate is established as on an ascite form of a teratocarcinoma СВА9Н6, and mice-recipients, however various doses of the entered methotrexate (6; 4 and 2 mkg/g body weights of an animal), at repeated introduction at an interval of 48 and 24 hours, don't destroy all population of embrioid bodies. So, at 3-fold and even 10-fold daily injections in a dose of 2 mkg/g of body weight in an abdominal cavity of mice  $1,6 \pm 0,2\%$  and  $0,038 \pm 0,01\%$  embrioid bodies (ascite form of a teratocarcinoma ) remain,

respectively, at survival of mice  $93,0 \pm 8,5\%$  and  $14,0 \pm 3,0\%$ . The morphological analysis of a mode of a differentiation of embrioid bodies retransplanted from experimental animals to intact has shown earlier that the methotrexate hasn't had effect on histoblastic potentialities of stem cells of a teratocarcinoma СВА9Н6.

◆ **Keywords:** action of a methotrexate; ascite form of a teratocarcinoma СВА9Н6; mice.

### ВВЕДЕНИЕ

Метотрексат, как антагонист фолиевой кислоты, воздействует на дигидрофолатредуктазу, нарушая при этом пуриновый обмен, подавляет синтез ДНК и приводит клетки к гибели. Цитостатические свойства данного препарата используют как для исследований в области клеточной биологии, иммунологии, генной инженерии, так и в клинической онкологии при лечении больных со злокачественными опухолями [3–5, 8–10, 13].

*Цель исследования.* Представляет интерес исследование на клетках тератомы — уникальном объекте, с одной стороны сходном по своим морфофункциональным свойствам с плюрипотентными клетками нормального зародыша, а с другой — приобретаем черты злокачественных опухолей [1, 7, 12]. Согласно классификации тератом мышевидных грызунов [1, 6], тератокарциномы, невзирая на возможный модус их дифференцировки, относят к злокачественным тератомам. Известно, что при трансплантации в брюшную полость перевивных линий

тератокарцином не только происходит размножение ее асцитной формы (эмбрионидные тельца), но и возникают солидные формы, образующиеся в результате прикрепления эмбрионидных телец к тканям животного-реципиента с последующим их ростом. В результате размножения клеток тератокарциномы животные-реципиенты погибают [2, 11]. Необходимо отметить, что одни линии злокачественных тератом в той или иной мере имеют определенный модус дифференцировки, в то время как другие являются нуллипотентными. Таким образом, изучение действия метотрексата на клетки тератокарциномы представляет интерес как с точки зрения экспериментальной биологии [12], так и с практической точки зрения, обусловленной наличием данной патологии в клинической онкологии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе была использована асцитная форма тератокарциномы (эмбрионидные тельца линии СВА9Н6), ранее полученная проф. Грехемом из зародышей мышей линии СВА. В брюшную полость мышей-реципиентов (самцов линии СВА, весом 18–20 г) трансплантировали по 5000 эмбрионидных телец. В первой серии опытов был изучен дозозависимый эффект действия метотрексата фирмы «Лейерс» (Финляндия) на выживаемость животных и эмбрионидных телец, для чего использовали препарат в дозе 2, а также 4 и 6 мкг/г массы тела мыши, который вводили внутрибрюшинно 3, 7 и 10 раз с интервалом 48 ч. Во второй серии опытов метотрексат в дозе 2 мкг/г вводили внутрибрюшинно ежедневно на протяжении 3–10 суток. В качестве контроля использовали животных, которым внутрибрюшинно вводили физраствор. Жизнеспособность клеток те-

ратокарциномы оценивали стандартными методами. С целью проверки модуса дифференцировки стволовых клеток тератокарциномы, выживших после действия метотрексата, осуществляли их последующие ретрансплантации в брюшную полость. Асцитные и солидные формы тератокарциномы подвергали гистологической обработке, а серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и азаном по Генденгайну.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования действия метотрексата на асцитную форму тератокарциномы (эмбрионидные тельца) и мышей-реципиентов суммированы в табл. 1.

Анализ полученных данных свидетельствует о выраженном дозозависимом эффекте между количеством вводимого через 48 ч препарата и гибелью асцитной формы (эмбрионидных телец) тератокарциномы, а также животных-реципиентов. Необходимо подчеркнуть, однако, что при различных вариантах введения метотрексата полностью уничтожить популяцию злокачественных клеток в условиях *in vivo* не удастся. Так, при трехкратных и даже десятикратных ежедневных инъекциях препарата в дозе 2 мкг/г массы тела в брюшной полости мышей сохраняется  $1,6 \pm 0,2$  и  $0,038 \pm 0,01$  % эмбрионидных телец соответственно при выживаемости мышей  $93,0 \pm 8,5$  и  $14,0 \pm 3,7$  %.

Ретрансплантация асцитной формы тератокарциномы, на которую ранее воздействовали метотрексатом, интактным животным и последующий гистологический анализ выявили идентичность гистобластических потенциалов стволовых клеток эмбрионидных телец.

■ Таблица 1. Действие различных доз метотрексата (в мкг/г) на жизнеспособность асцитной формы (эмбрионидные тельца) тератокарциномы СВА9Н6 и выживаемость мышей-реципиентов

Условия опыта	Введение метотрексата через							
	48 ч			24 ч	48 ч			24 ч
Доза (мкг/г)	6	4	2	2	6	4	2	2
Число введений	Выживаемость мышей (в %)				Количество жизнеспособных эмбрионидных телец тератокарциномы (в %)			
3	$80 \pm 14,1$	$90 \pm 12,1$	$98 \pm 7,2$	$93 \pm 8,5$	$1,1 \pm 1,0$	$5,2 \pm 1,0$	$7,3 \pm 2,1$	$1,6 \pm 0,2$
7	$25 \pm 5,0$	$50 \pm 8,6$	$86 \pm 15,2$	$52 \pm 10,0$	$0,4 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2$	$4,5 \pm 1,0$	$0,5 \pm 0,1$
10	0	$25 \pm 6,3$	$44 \pm 8,2$	$14,0 \pm 3,7$	–	$0,2 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	$0,04 \pm 0,01$

## ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе были использованы разные временные параметры введения препарата, при этом учитывали ряд факторов, в том числе и время циркуляции метотрексата в организме, а также продолжительность цикла репликации клеток тератокарциномы. Применение в одной из схем ежедневных инъекций метотрексата (по сравнению с интервалом 48 ч) обусловлено тем, что митотический цикл клеток тератокарциномой колеблется в пределах от 11 до 20 ч [2], а период полураспада данного препарата составляет 5–9 ч при диапазоне абсорбции 50–100 % [3]. Необходимо отметить, что согласно литературным данным [3] и через 48 ч после суточной инфузии метотрексата в крови выявлялось 0,05 % препарата. Установлен дозозависимый эффект метотрексата как на выживаемость мышей-реципиентов, так и на асцитную форму тератокарциномы. Несмотря на использование различных схем введения метотрексата (дозы препарата, интервал между инъекциями, количество инъекций), в том числе и приводящих к массовой гибели животных-реципиентов, не удается уничтожить все 100 % эмбрионидных теллец (асцитная форма) тератокарциномы СВА9Н6. Проведенная нами ретрансплантация тератокарциномных клеток показала, что после действия метотрексата модус их дифференцировки не изменился, то есть гистобластические потенции не отличались от исходной линии. Этот вывод имеет принципиальное значение. Дело в том, что асцитная форма злокачественных тератом может быть представлена как стволовыми, так и дифференцирующимися клетками, причем спектр дифференцировок и их степень характеризуют ту или иную линию созданных исследователями эмбрионидных теллец (от плюрипотентных до нуллипотентных) [1, 6]. Таким образом, метотрексат при данном варианте эксперимента и на данной линии тератокарциномы не оказал действия на гистобластические потенции стволовых клеток тератокарциномы СВА9Н6. Естественно, для подтверждения или опровержения столь важного для биологии стволовых клеток предположения необходимы дальнейшие исследования на других линиях тератокарцином с разным модусом дифференцировки.

Следует подчеркнуть, что в клинической практике отработаны и применяются схемы назначения метотрексата как химиотерапевтический способ лечения различных опухолей [3, 5, 8, 13], в том числе и при внутригонадном расположении озлокачествленных тератом. Наши же исследования, выполненные в условиях *in vivo*, заполняют определенный пробел в экспериментальной биологии и выполнены не на модели внутригонадной озлокачествляющейся тератомы, а на асцитной форме тератокарциномы (эмбрионидных тельцах), развивающейся вне гонады, то есть в брюшной полости животных-реципиентов. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что использование более жестких по сравнению

с клиникой схем введения препарата, в результате чего происходит и гибель определенного количества животных-реципиентов, не уничтожает на 100 % асцитную форму тератокарциномы СВА9Н6. Полученные результаты могут составить основу для дальнейших исследований как в области биологии развития, так и в области биологии стволовых клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тератокарциномы мышевидных грызунов могут не только служить моделями для изучения механизмов патологического развития, но и быть использованы в экспериментальной онкологии для исследования действия различных препаратов на опухоли, в частности герминативные.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дыбан П.А. Использование тератом мышевидных грызунов для исследования механизмов цитодифференцировки и гистогенеза // Опухолевый рост как проблема биологии развития / Под ред. В.И. Гельштейна. – М.: Наука, 1979. – С. 174–207. [Dyban P. The use of teratomas of rodents to study the mechanisms of cytodifferentiation and histogenesis. In: Tumor growth as a problem of developmental biology. Ed by V.I. Gelstein. Moscow: Science; 1979. P. 174-207. (In Russ.)]
2. Дыбан П.А. Особенности роста и дифференцировки тератокарциномы OC15S1 в сингенных и аллогенных мышцах // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1984. – № 1. – С. 71–72. [Dyban PA. Peculiarities of the growth and differentiation of teratocarcinoma OC15S1 in syngeneic and allogeneic mice. *Bull Exp Biol Med*. 1984;(1):71-72. (In Russ.)]
3. Родионов Г.Г., Шантырь И.И., Ушал И.Э., и др. Опыт определения концентрации противоопухолевых препаратов как способ обеспечения безопасности фармако-терапии // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2018. – Т. 16. – № 1. – С. 64–70. [Rodionov GG, Shantyr II, Ushal IE, et al. Experience of determination of antitumour drugs content as a method of providing the safety of pharmacotherapy. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2018;16(1):64-70. doi: 10.17816/RCF16164-70. (In Russ.)]
4. Bertino JR, Göker E, Gorlick R, et al. Resistance mechanisms to methotrexate in tumors. *Oncologist*. 1996;1(4):223-226. doi: 10.1002/stem.140005.
5. Chabner BA, Roberts TG. Jr. Chemotherapy and the war on cancer. *Cancer*. 2005;5:65-72.
6. Damjanov I, Andrews PW. The terminology of teratocarcinomas and teratomas. *Nature Biotechnol*. 2007;25:1212. doi: 10.1038/nbt1107-1212a.
7. Gropp M, Shilo V, Vainer G, et al. Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human ES cells and biosafety of their differentiated progeny. *PLoS ONE*. 2012;7: e45532.

8. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, et al. The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med.* 1983;309(18):1094-1104. doi: 10.1056/NEJM198311033091805.
9. Osborn MJ, Freeman M, Huennekens FM. Inhibition of dihydrofolic reductase by aminopterin and amethopterin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1958;97:429-431. doi: 10.3181/00379727-97-23764.
10. Osborn MJ, Huennekens FM. Enzymatic reduction of dihydrofolic acid. *J Biol Chem.* 1958;233:969-974.
11. Pierce GB. Teratocarcinoma: model for a developmental concept of cancer. *Curr Top Dev Biol.* 1967;2:223-246. doi: 10.1016/S0070-2153(08)60289-6.
12. Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: A history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet.* 2006;7:319-327.
13. Zulfequar A, Tripathi R, Brahmeshwar M. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2012;9(2):151-169. doi: 10.1517/17425247.2012.642362.

## ♦ Информация об авторе

Павел Андреевич Дыбан — д-р мед. наук, доцент, ведущий научный сотрудник Отдела молекулярной генетики. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. E-mail: pavandy@mail.ru.

## ♦ Information about the author

Pavel A. Dyban – Dr. Med. Sci., Associate Professor, Leading Researcher, Department of Mol. Genetics. Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia. E-mail: pavandy@mail.ru.