

*В.Г. Беспалов^{1,2}, Е.А. Вьшинская¹, И.Н. Васильева¹, Г.В. Точильников¹, А.Л. Семенов¹,
А.Н. Стуков¹, В.А. Александров¹*

Повышение эффективности лечения канцероматоза брюшной полости с помощью интраперитонеальной полихимиотерапии на модели диссеминированного рака яичника

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,
²Университет ИТМО,
Санкт-Петербург

Интраперитонеальная химиотерапия потенциально может существенно улучшить результаты лечения больных с канцероматозом брюшной полости при раке яичника (РЯ). Целью исследования явилось сравнение противоопухолевой активности комбинированного действия цитостатиков диоксидэпта и мелфалана, диоксидэпта и митомицина С при их интраперитонеальном введении, с эффектами данных препаратов в монорежиме. На модели перевиваемой опухоли яичника у 74 крыс-самок однократно вводили: диоксидэпт, мелфалан или митомицин С в дозах 1,5; 2; 1,5 мг/кг массы тела, соответственно, или комбинации данных препаратов в половинных дозах. Противоопухолевые эффекты лечения оценивали по медиане продолжительности жизни (МПЖ) крыс в различных группах. Диоксидэпт, митомицин С и мелфалан при интраперитонеальном введении статистически значимо увеличивали МПЖ на 67, 28 и 103 %, соответственно. Комбинация диоксидэпта и митомицина С не проявила значимого аддитивного противоопухолевого эффекта. Комбинация диоксидэпта и мелфалана проявила потенцирующий эффект, значимо увеличила МПЖ на 186 %, и может быть рекомендована для клинических испытаний у больных с диссеминированным РЯ.

Ключевые слова: рак яичника, канцероматоз брюшной полости, интраперитонеальная химиотерапия

В России рак яичников (РЯ) занимает 8-е место в структуре онкологической заболеваемости женщин и 3-е место — среди гинекологических опухолей после рака тела и шейки матки, заболеваемость РЯ растет [5]. По данным популяционных раковых регистров стран Европы, однолетняя выживаемость больных РЯ составляет 63 %, трехлетняя — 41 %, пятилетняя — 35%. [8]. При РЯ наиболее часто опухолевые массы можно обнаружить на перитонеальных поверхностях. В большинстве случаев злокачественного течения РЯ диссеминация происходит путем

эксплозии опухолевых клеток с поверхности пораженной яичниковой ткани с током внутрибрюшинной жидкости по всей брюшной полости, поражая париетальную и висцеральную брюшину, преимущественно правую половину диафрагмы и капсулу печени [6]. Лечение РЯ основано на интеграции хирургии и химиотерапии. Значение хирургического этапа в комбинированном лечении подчеркивается во всех исследованиях, посвященных проблеме распространенного РЯ. Качество выполненного циторедуктивного вмешательства в значительной мере определяет последующий прогноз. Однако, начиная со стадии IC, хирургическую операцию всегда следует считать условно радикальной, и всем больным распространенным РЯ показана системная химиотерапия. Недостаточно удовлетворительные результаты стандартного лечения требуют поиска новых подходов к лекарственному лечению больных, таких, как, например, интраперитонеальная химиотерапия (ИХТ).

Число исследований по изучению ИХТ невелико. С 1970 года GOG (группа онкогинекологической гинекологии) является одним из лидеров в области клинических исследований в онкогинекологии. Проведены серии рандомизированных исследований, сочетающих стандартный внутривенный (в/в) и внутрибрюшинный (в/б) способы введения химиопрепаратов. На основании метаанализа 7 рандомизированных исследований, проведенных National Cancer Institute и GOG в 2006 году, продемонстрированы преимущества в/б химиотерапии с использованием цисплатина, значимо повышающей общую выживаемость составила с 49,7 до 65,6 месяцев и снижающей относительный риск смерти на 21,6%, проведение ИХТ рекомендовано больным с остаточной опухолью менее 10 мм после циторедуктивной операции при РЯ [12].

Ранее нами в эксперименте на самках крыс с перевитым РЯ было установлено, что ИХТ различными цитостатиками, применяемыми в клинике для лечения РЯ, такими, как диоксидэпт, цисплатин, мелфалан и циклофосфан значитель-

но более эффективна, чем в/в введение данных препаратов, другие, например, паклитаксел, оказывают сравнимое противоопухолевое действие при в/б и в/в введении [3]. Опробованы также и некоторые схемы комбинированной ИХТ, показано значимое аддитивное противоопухолевое действие диоксидэнта с цисплатином, с циклофосфаном, с паклитакселем [4]. Представляется перспективной разработка новых схем комбинированной ИХТ, сочетающая преимущества контактного и аддитивного противоопухолевого действия новых комбинаций препаратов.

Цель исследования — сравнение противоопухолевой активности комбинированного действия цитостатиков диоксидэнта и мелфалана, диоксидэнта и митомидина С при их интраперитонеальном введении, с эффектами данных препаратов в монорежиме на модели перевиваемого РЯ у самок крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 74 крысах-самках Вистар разводки ФГУП «Рапполово» (Россия, Ленинградская область) в возрасте 1,5–2,5 месяца с начальной массой тела 150–180 г. Все животные содержались в стандартных условиях вивария, получали стандартный полнорационный брикетированный комбикорм (Лабораторкорм, Москва, Россия) и питьевую водопроводную воду без ограничений. Содержание и все манипуляции с крысами проводили в соответствии с требованиями действующих стандартов по содержанию и использованию лабораторных животных.

Использован штамм РЯ из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, который перевозили и хранили в жидком азоте. Использованы следующие цитостатики: диоксидэнт (Кемконсалт, Санкт-Петербург, Россия); митомидин С (веро-митомидин, Лэнс-Фарм, Россия), мелфалан (Алкран, GlaxoSmithKline, Италия).

Перевивка опухоли яичника. Полученный асцит от одной крысы-самки с перевитой РЯ использовался для перевивки экспериментальным животным после разведения. После предварительного пассажа РЯ 3–4 крысам на 7-й или 8-й день после в/б перевивки РЯ от одной крысы брали асцит и перевивали животным экспериментальных групп в/б по 0,5 мл асцитической жидкости, разведенной физиологическим раствором, и содержащей 1×10^7 клеток. Для перевивки готовили разведения асцита в соотношении 1+7 (к 1 мл асцита добавляют 7 мл физиологического раствора), вводили по 0,5 мл в/б, точное число клеток на крысу: 1×10^7 клеток в 0,5 мл физиологического раствора.

Группы животных и схемы введения препаратов. 1 группа. Контроль — физиологический раствор в/б. 19 крыс. Вводили однократно в/б физиологический раствор по 2 мл на крысу. 2 группа. Диоксидэнт в/б в МПД. 10 крыс. Вводили однократно в/б диоксидэнт субстанцию в дозе 1,5 мг/кг массы тела в физиологическом растворе. 3 группа. Митомидин С в/б в МПД. 10 крыс. Вводили однократно в/б митомидин С в дозе 1,5 мг/кг массы тела. 4 группа. Мелфалан в/б в МПД. 10 крыс. Вводили однократно в/б мелфалан в дозе 2 мг/кг массы тела, в прилагаемом растворителе. 5 группа. Диоксидэнт в/б в 1/2 от МПД + Митомидин С в/б в 1/2 от МПД. 10 крыс. Вводили однократно в/б диоксидэнт в дозе 0,75 мг/кг и митомидин С в дозе 0,75 мг/кг массы тела в физиологическом растворе. 6 группа. Диоксидэнт в/б в 1/2 от МПД + Мелфалан в/б в 1/2 от МПД. 10 крыс. Вводили

однократно в/б диоксидэнт в дозе 0,75 мг/кг и мелфалан в дозе 1 мг/кг массы тела в физиологическом растворе.

В день гибели вскрывали брюшную и грудную полости крысы. Проводилась качественная оценка асцитической жидкости и описывались опухолевые поражения органов брюшной и грудной полости и другие видимые макроскопические изменения. Диагноз ОЯ подтверждался цитологическим исследованием асцитической жидкости. Мазок асцита подвергался стандартной цитологической обработке с окраской гематоксилином (БиоВитрум, Россия) и водно-спиртовым раствором эозина (БиоВитрум, Россия) и анализировался методом световой микроскопии на лабораторном бинокулярном микроскопе «Leica» (Leica Microsystems, Германия).

Выживаемость регистрировалась ежедневно. Протоколировался день гибели после перевивки, который использовался для расчета медианы продолжительности жизни (МПЖ) и увеличения продолжительности жизни (УПЖ). Противоопухолевые эффекты препаратов оценивались по МПЖ и УПЖ в сравнении с контролем. УПЖ для МПЖ в % рассчитывали по формуле:

$$\text{УПЖ} = \frac{\text{МПЖ}_0 - \text{МПЖ}_к}{\text{МПЖ}_к} \times 100,$$

где МПЖ₀ и МПЖ_к — соответственно МПЖ крыс опытной и контрольной группы.

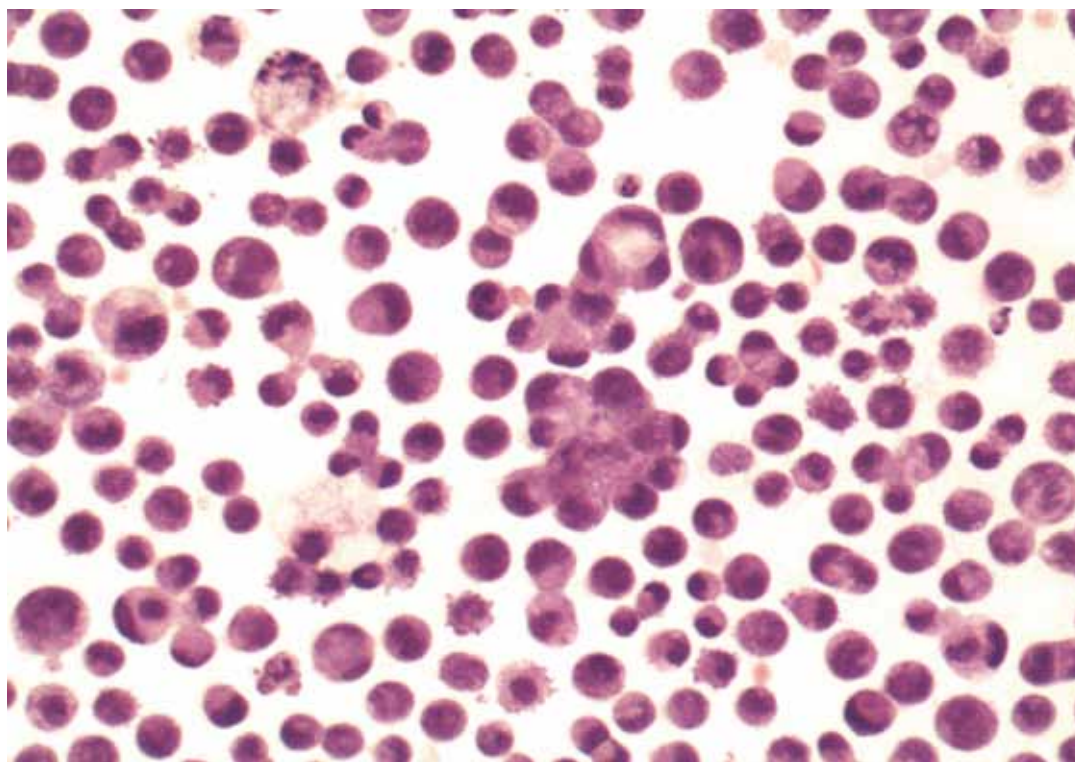
Статистический анализ проводили с помощью непараметрического критерия U (Манна-Уитни) в программах “GraphPad Prism 6” и “SPSS Statistics 17.0”, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

РЯ прививался у 100% крыс, быстро прогрессировал, вызывая у всех крыс асцит и приводя к гибели животного. На вскрытии у крыс наблюдали асцит, канцероматоз висцеральной и париетальной брюшины, большого и малого сальника, брыжейки кишечника, метастатическое поражение лимфатических узлов брюшной полости, забрюшинного пространства и средостения; опухоль в виде творожистой массы в пространстве между диафрагмой и печенью, желудком и печенью; у части крыс асцит был геморрагический. При цитологическом исследовании мазков асцитической жидкости опухолевые клетки в асците представляются крупными, округлыми с крупным оптически плотным ядром и резко базофильной цитоплазмой, в мазке также присутствуют клетки меньшего размера, в цитоплазме расположены вакуоли, количество которых от клетки к клетке широко варьирует, на поверхности цитоплазмы крупных клеток имеются базофильные выступы; при цитологическом исследовании мазков асцитической жидкости видны патологические митозы опухолевых клеток; местами клетки в асцитической жидкости образуют комплексы, что характерно для аденокарцином (рис. 1). С учетом происхождения, опухоль является низкодифференцированным эпителиальным РЯ. При гистологическом исследовании канцероматозных узлов брюшины, пораженных

Таблица 1. Выживаемость крыс самок после перевивки опухоли яичника из групп с внутривентральным введением диоксидэнта, митомицина С, мелфалана, диоксидэнта + митомицина С, диоксидэнта + мелфалана

Группа	Показатель			
	Число крыс	МПЖ, дни	УПЖ, %	Статистическая значимость, р
1. Контроль в/б	19	18,0 (12,7–23,3)		
2. Диоксидэнт в/б МПД	10	30,0 (28,5–31,5)	67	р=0,006 (1), р<0,001 (6)
3. Митомицин С в/б МПД	10	23,0 (15,8–28,2)	28	
4. Мелфалан в/б МПД	10	36,5 (23,6–48,4)	103	р<0,001 (1), р=0,030 (6)
5. Диоксидэнт в/б 1/2 МПД + митомицин С в/б 1/2 МПД	10	31,0 (25,4–34,7)	72	р=0,005 (1)
6. Диоксидэнт в/б 1/2 МПД + мелфалан в/б 1/2 МПД	10	51,5 (41,7–60,3)	186	р<0,001 (1, 2), р=0,030 (4)

Рис. 1. Клетки опухоли яичника в асцитической жидкости, клетки образуют комплексы, цитологический препарат, окраска гематоксилин/эозином, $\times 400$

лимфатических узлов брюшной и грудной полости диагностированы метастазы ОЯ.

При однократном в/б введении все исследованные цитостатики: диоксидэнт, митомицин С и мелфалан значительно увеличивали МПЖ по сравнению с контролем соответственно на 67, 28 и 103% (табл. 1). Комбинированное в/б введение препаратов также приводило к значимому увеличению МПЖ по сравнению с контрольной группой, на 72% для комбинации диоксидэнта и митомицин С, и на 186% для комбинации диоксидэнта и мелфалана (табл. 1). Однако в случае комбинации диоксидэнта и митомицин С увеличение МПЖ по сравнению как с диоксидэнтом, так и митомицином С в монорежиме не было статистически достоверно (табл. 1). В комбинации введение диоксидэнта и мелфалана оказалось статистически значимо эффективнее по сравне-

нию с введением препаратов в монорежиме, в том числе и по сравнению с наиболее эффективным препаратом мелфаланом.

Обсуждение результатов

Для оценки эффективности противоопухолевых эффектов цитостатиков была использована модель асцитной РЯ, отличающаяся хорошей воспроизводимостью и близкая по клиническому течению и морфологическому типу к диссеминированному эпителиальному РЯ человека. В приведенном исследовании, как и в других наших работах [3, 4], у крыс в 100% развивался метастатический РЯ. У всех животных возникал асцит, а при вскрытии наблюдался канцероматоз париетальной и висцеральной брюшины, купола диафрагмы, опухолевое поражение большого и

малого сальника, брыжейки кишечника, метастатическое поражение лимфоузлов брюшной полости, забрюшинного пространства и средостения, что соответствует процессам канцерогенеза и клинической картине распространенного РЯ у человека. МПЖ после перививки РЯ животных составляла от 8,0 до 37,0 дней. Таким образом, перевиваемый РЯ развивается у экспериментальных животных так же, как при далеко зашедших стадиях РЯ у человека, и является адекватной моделью для разработки новых методов лечения диссеминированного РЯ.

Нами впервые была проведена серия экспериментов на крысах самках по изучению эффективности различных цитостатиков только при в/б введении, как в монорежиме, так и в комбинации препаратов. В клинических исследованиях по изучению в/б способа введения не было проведено прямого сравнения эффективности того или иного химиотерапевтического препарата. По этическим соображениям в клинических протоколах всегда использовалась комбинация в/б и в/в способов введения [12].

Поскольку препараты исследовались интраперитонеально, при их контактном действии, по-видимому, такие их свойства, как молекулярная масса, показатель АUC, гидрофильность или липофильность, необходимость метаболической активации [2] влияют на их эффективность и при комбинированной ИХТ. Эффективность комбинации диоксидэта и мелфалана, возможно, определяется сочетанием липофильных и гидрофильных свойств диоксидэта [1] и липофильности мелфалана [7], такое сочетание ранее показало свою эффективность в комбинации диоксидэта и цисплатина [4].

Из представленных препаратов только митомицин С, алкилирующий агент, содержащий 3 потенциально активные алкилирующие группы — хинол, уретан и азиридин, после биоактивации *in vivo* ферментами митохондрий (восстановление хинонной группы), превращается в соединение, непосредственно реагирующее с ДНК [10]. По-видимому, необходимость метаболической активации не дает преимуществ при ИХТ ни в монорежиме [2], ни в комбинации диоксидэта и митомицина С при их в/б введении.

Эффективность действия препаратов-цитостатиков определяется способностью вызывать гибель опухолевых клеток. В случае если общее количество поврежденных участков ДНК превышает репарационные возможности клетки, запускается р53-зависимый апоптоз. Для клетки млекопитающих 40 сшивок уже делают репарацию невозможной, вызывая гибель клеток [9]. Механизм действия алкилирующих цитостатиков, таких как диоксидэт и мелфалан, связан с прямым действием на ДНК клетки, вне особой

зависимости от клеточного цикла, с образованием внутри- и межспиральных сшивок ДНК клеток [7]. Основным в механизме противоопухолевой активности является диоксидэта и мелфалана является алкилирование ДНК и белков. Своеобразие механизма действия мелфалана заключается не только в том, что продукты его биотрансформации включаются в метаболизм опухолевых клеток как структурные аналоги метаболитов незаменимой аминокислоты фенилаланина, а также в нарушении ферментного обмена, в частности активности фосфомоноэстераз, которые играют роль в энергетических процессах и в делении и дифференцировке опухолевых клеток [11]. Синегризм комбинации диоксидэта и мелфалана можно объяснить тем, что оба препарата разными путями повреждают как генетический аппарат клетки, так и энергетический обмен, дополнительно приводя к активации митохондриального апоптоза.

Выводы

1. Схема ПХТ диоксидэт + мелфалан проявляет потенцирующее противоопухолевое действие на модели диссеминированного РЯ у крыс.
2. Схема ПХТ диоксидэт + митомицин С на модели диссеминированного РЯ у крыс не дает преимуществ по сравнению с монотерапией данными препаратами.
3. Разработанная новая эффективная схема ПХТ диоксидэт в/б + мелфалан в/б предлагается для клинических испытаний у больных с диссеминированным РЯ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беспалов В.Г., Беляева О.А., Панченко А.В. и др. Противоопухолевое действие диоксидэта в сравнении с цисплатином на модели асцитной опухоли яичника у крыс // *Вопр. Онкол.* — 2011. — Т. 57. — № 6. — С. 771–774.
2. Беспалов В.Г., Вышинская Е.А., Васильева И.Н. и др. Сравнительное исследование противоопухолевой эффективности цитостатиков при внутрибрюшном и внутривенном введении на модели диссеминированного рака яичника у крыс // *Бюлл. эксп. биол. мед.* — 2016. — Т. 162. — № 9. — С. 370–373.
3. Вышинская Е.А., Беспалов В.Г., Васильева И.Н. и др. Преимущества интраперитонеальной химиотерапии в лечении канцероматоза брюшной полости при раке яичника // *Журнал акушерства и женских болезней.* — 2014. — Т. 63. — № 2. — С. 28–34.
4. Вышинская Е.А., Беспалов В.Г., Васильева И.Н. и др. Новые схемы интраперитонеальной полихимиотерапии для лечения канцероматоза брюшной полости при раке яичников // *Журнал акушерства и женских болезней.* — 2014. — Т. 63. — № 5. — С. 46–53.
5. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. — М.:

- МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. — 250 с.
6. Auer K., Bachmayr-Heida A., Aust S. et al. Peritoneal tumor spread in serous ovarian cancer — epithelial mesenchymal status and outcome // *Oncotarget*. — 2015. — Vol. 6. — № 19. — P. 17261–17275.
 7. Chamber B.A., Lynch Th.J., Longo D.L. *Harrison's Manual of oncology*. — Mc Graw Hill Medical: New York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, San Juan, Seoul, Singapore, Sydney, Toronto, 2008. — 625 ps.
 8. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [Электронный ресурс]. URL: <http://globocan.iarc.fr>. (дата обращения 11.01.2018 г.)
 9. Orlando D., Schäfer O.D. DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses//*Chem. Biochem.* — 2005. — Vol. 6. — P. 27–32.
 10. Paz M.M., Zhang X., Lu J., Holmgren A. A new mechanism of action for the anticancer drug mitomycin C: mechanism-based inhibition of thioredoxin reductase// *Chemical Research in Toxicology*. — 2012. — Vol. 25. — № 7. — P. 1502-1511.
 11. Samuels B.L., Bitran J.D. High-dose intravenous melphalan: a review // *J. Clin. Oncol.* — 1995. — Vol. 13. — № 7. — P. 1786-1799.
 12. Trimble E.L., Christian M.C. National Cancer Institute — United States strategy regarding intraperitoneal chemotherapy for ovarian cancer//*Int. J. Gynecol. Cancer*. — 2008. — Vol. 18. — Suppl. 1. — P. 26–28. — doi: 10.1111/j.1525-1438.2007.01100.x.

Поступила в редакцию 28.02.2018 г.

*V.G. Beshpalov^{1,2}, E.A. Vyshinskaya¹, I.N. Vasilyeva¹,
G.V. Tochilnikov¹, A.L. Semenov¹, A.N. Stukov¹,
V.A. Aleksandrov¹*

Improvement of efficiency of treatment of abdominal canceromatosis by intraperitoneal polychemotherapy on model of disseminated ovarian cancer

¹N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology
²ITMO University
St. Petersburg

Intraperitoneal chemotherapy can potentially significantly improve the results of treatment of patients with abdominal canceromatosis in ovarian cancer (OC). The aim of the study was to compare the antitumor activity of the combined action of cytostatics: dioxadet and melphalan, dioxadet and mitomycin C with their intraperitoneal administration, with the effects of these drugs in mono mode. In the model of transplanted ovarian tumor in 74 female rats, a single dose was administered: dioxadet, melphalan, or mitomycin C in doses of 1.5; 2; 1.5 mg/kg body weight, respectively, or a combination of these drugs in half doses. Antitumor effects of the treatment were assessed by the median survival time (MST) of rats in various groups. Dioxadet, mitomycin C and melphalan with an intraperitoneal administration statistically significantly increased the MST by 67, 28 and 103%, respectively. The combination of dioxadet and mitomycin C did not show a significant additive antitumor effect. The combination of dioxadet and melphalan showed a potentiating effect, significantly increased the VST by 186%, and can be recommended for clinical trials in patients with disseminated OC.

Key words: ovarian cancer, abdominal canceromatosis, intraperitoneal chemotherapy