

Для цитирования: Муразов Я.Г., Семенов А.Л., Сенчик К.Ю., Нюганен А.О., Артемьева А.С., Беляев А.М. Оценка противоопухолевой активности локальной внутрибрюшинной гипертермии на модели распространенной high-grade карциномы яичника у крыс. Сибирский онкологический журнал. 2021; 20(6): 78–87. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-6-78-87
For citation: Murazov Ia.G., Semenov A.L., Senchik K.Yu., Niuganen A.O., Artemyeva A.S., Belyaev A.M. Evaluation of the antitumour activity of local intraperitoneal hyperthermia in a model of advanced high-grade ovarian carcinoma in rats. Siberian Journal of Oncology. 2021; 20(6): 78–87. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-6-78-87

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЛОКАЛЬНОЙ ВНУТРИБРЮШИННОЙ ГИПЕРТЕРМИИ НА МОДЕЛИ РАСПРОСТРАНЕННОЙ HIGH-GRADE КАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА У КРЫС

**Я.Г. Муразов, А.Л. Семенов, К.Ю. Сенчик, А.О. Нюганен, А.С. Артемьева,
А.М. Беляев**

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
Россия, 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68.
E-mail: yaroslav84@yandex.ru

Аннотация

Проведены разведочная оценка противоопухолевой активности гипертермической интраперитонеальной перфузии (ГИПП) с 0,9 % раствором натрия хлорида и сравнение ее с эффектами однократного нормотермического внутрибрюшинного (в/б) введения цисплатина в максимально переносимой дозе (МПД). Тридцать шесть половозрелых крыс-самок Wistar с трансплантированной в/б сингенной карциномой яичника были рандомизированы в три группы: контрольная (в/б инъекция 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида при комнатной температуре, $n=12$); группа цисплатина (в/б инъекция цисплатина 4 мг/кг при комнатной температуре, $n=12$); группа ГИПП (открытая в/б перфузия с 0,9 % раствором натрия хлорида при температуре 40,5–41,5 °C в течение 45 мин, $n=12$). Первичной конечной точкой была оценка общей выживаемости (ОВ) животных в каждой из трех групп. На аутопсии павших животных оценивали общий индекс перитонеального канцероматоза (ИПК), массу и степень геморрагии асцита. Медиана ОВ в контрольной группе, ГИПП и цисплатина составила 19, 39 и 40 дней соответственно (логранговый тест $p<0,0001$). В сравнении с контрольной группой различия были статистически значимы как для цисплатина (ОР=0,22; 95 % ДИ 0,08–0,62; логранговый тест $p<0,0001$), так и для ГИПП (ОР=0,32; 95 % ДИ 0,13–0,82; логранговый тест $p=0,0013$). Различий ОВ между группами цисплатина и ОВ не было (логранговый тест $p=0,4853$). Процедура ГИПП была ассоциирована с достоверным снижением общего ИПК, тенденцией к уменьшению массы асцита и более высокой степенью выраженности геморрагии. По показателю ОВ противоопухолевая активность ГИПП без цитостатика была сопоставима с однократным нормотермическим в/б введением цисплатина в МПД и превосходила эффекты последнего в отношении развития перитонеального канцероматоза.

Ключевые слова: карцинома яичника, перитонеальный канцероматоз, внутрибрюшинная химиотерапия, HIPEC, цисплатин, доклинические исследования.

EVALUATION OF THE ANTITUMOUR ACTIVITY OF LOCAL INTRAPERITONEAL HYPERTHERMIA IN A MODEL OF ADVANCED HIGH-GRADE OVARIAN CARCINOMA IN RATS

**Ia.G. Murazov, A.L. Semenov, K.Yu. Senchik, A.O. Niuganen, A.S. Artemyeva,
A.M. Belyaev**

N.N. Petrov National Medical Research Centre of Oncology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia
68, Leningradsкая str., 197758, Saint-Petersburg, Russia.
E-mail: yaroslav84@yandex.ru.

Abstract

In our study we carried out an exploratory assessment of the antitumor activity of hyperthermic intraperitoneal perfusion (HIPEP) with 0.9 % sodium chloride solution and compared it with the effect of a single normothermic intraperitoneal (i.p.) administration of cisplatin in the maximum tolerated dose (MTD). Thirty-six mature female Wistar rats with transplanted i.p. syngeneic ovarian carcinoma were randomized into three groups: control group (2 ml of 0.9 % sodium chloride i.p. at room temperature, n=12); cisplatin group (cisplatin 4 mg/kg i.p. at room temperature, n=12); HIPEP group (open i.p. perfusion with 0.9 % sodium chloride solution at a temperature of 40,5–41,5 °C for 45 minutes, n=12). The primary endpoint was the overall survival (OS) of the animals in each of the three groups. The total peritoneal cancer index (PCI), weight and degree of ascites haemorrhagia were assessed at autopsy. The median OS in the control group, HIPEP, and cisplatin was 19, 39, and 40 days, respectively (log-rank test $p < 0.0001$). In comparison to the control group, the differences were statistically significant for both cisplatin (HR=0.22; 95 % CI: 0.08–0.62; log-rank test $p < 0.0001$) and HIPEP (HR=0.32; 95 % CI 0.13–0.82; log-rank test $p = 0.0013$). There were no differences in OS between the cisplatin and HIPEP groups (log-rank test $p = 0.4853$). The HIPEP procedure was associated with a significant decrease in total PCI, a tendency towards a decrease in the ascites weight and a higher severity of haemorrhagia. In terms of OS, local hyperthermia, provided by HIPEP without a cytostatic drug, was comparable with single normothermic i.p. administration of cisplatin in MTD and exceeded the effects of the latter in relation to the development of peritoneal carcinomatosis.

Key words: ovarian cancer, peritoneal carcinomatosis, intraperitoneal chemotherapy, HIPEC, cisplatin, preclinical trials.

Введение

Несмотря на успехи в хирургическом и лекарственном лечении рака яичника, смертность от этого злокачественного новообразования остается высокой [1]. Эпителиальный рак яичника (ЭРЯ) является основным гистологическим типом. Серозная карцинома высокой степени злокачественности (СКВСЗ) – основной подтип ЭРЯ, на долю которого приходится до 90 % случаев смерти [2]. Из-за отсутствия специфических клинических симптомов около 80 % случаев ЭРЯ диагностируются на стадии распространенного процесса. Внутривнутрибрюшинная диссеминация является преобладающим вариантом метастазирования ЭРЯ [3]. У больных ЭРЯ и перитонеальным канцероматозом (ПК) 5-летняя общая выживаемость (ОВ) не превышает 25–29 % [4]. Применение системной химиотерапии (ХТ) позволяет добиться высокой частоты опухолевого ответа, однако рецидивы распространенного ЭРЯ возникают примерно в 75 % [3].

Перитонеальный канцероматоз следует рассматривать как локальное заболевание, требующее особых подходов к лечению. Внутривнутрибрюшинное распространение, характерное как для первичного ЭРЯ, так и для его рецидивов, стало поводом для широкого изучения локальной ХТ. Внутривнутрибрюшинная химиотерапия (ВБХТ) направлена против микроскопических опухолевых очагов, невидимых для глаза хирурга, оставшихся после выполнения оптимального циторедуктивного вмешательства. Введение противоопухолевых препаратов в брюшную полость может осуществляться несколькими способами: 1) адъювантная нормотермическая ВБХТ через перитонеальную порт-систему после циторедуктивных вмешательств; 2) перитонеальная перфузия брюшной полости нагретым до определенной температуры (40,5–43 °C)

раствором-носителем, содержащим противоопухолевый препарат (гипертермическая интраперитонеальная химиотерапия, HIPEC). Известную неопределенность в оценке эффективности, безопасности и целесообразности проведения HIPEC и нормотермической ВБХТ при ПК у пациентов с ЭРЯ вносит отсутствие прямых проспективных сравнительных исследований этих локальных методов лечения. Так, крупное хорошо спланированное исследование III фазы van Driel W.J. et al. [5] подвергается критике из-за отсутствия сравнения HIPEC с нормотермической ВБХТ.

Следует отметить, что гипертермия не только повышает противоопухолевую активность цитостатиков, но и сама обладает противоопухолевой активностью. Гипертермия для лечения злокачественных новообразований стала применяться с конца XIX в. В работах Coley, Byrne, Gottschalk, Mayo, Percy и др. описаны случаи применения локальной гипертермии для лечения различных видов опухолей [6]. Важной задачей в изучении гипертермических перфузионных технологий является получение современных данных о противоопухолевой активности и механизмах действия самой гипертермии в отношении ПК при распространенных опухолях яичника. В представленном исследовании мы изучили противоопухолевую активность открытой ГИПП (40,5–41,5 °C) с 0,9 % раствором натрия хлорида и сравнили ее с эффектами однократного нормотермического в/б введения цисплатина в МПД (4 мг/кг) у крыс-самок Wistar с трансплантированной сингенной карциномой яичника.

Цель исследования – оценка противоопухолевой активности гипертермической интраперитонеальной перфузии (ГИПП) с 0,9 % раствором натрия.



Рис. 1. Аппаратурно-техническое оснащение для экспериментальной ГИПП.

Примечание: 1 – набор магистралей и переходников; 2 – резервуар-приемник для перфузата; 3 – роликовый перфузионный насос; 4 – термостатируемая водяная баня; 5 – ветеринарный наркозный испаритель
Fig. 1. Hardware and technical equipment for the experimental HIPEP.

Note: 1 – a set of tubes and adapters; 2 – reservoir for perfusate; 3 – roller pump; 4 – thermostatic water bath; 5 – veterinary anesthetic vaporizer

Материал и методы

Дизайн эксперимента. День перевивки опухолевого штамма был принят за день 0. Все экспериментальные воздействия проводили через 48 ч после трансплантации опухолевого штамма. Животные были рандомизированы в три группы: ОЯ контроль в/б (n=12) – однократно в/б вводили 2 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида; ОЯ цисплатин в/б (n=12) – однократно в/б вводили цисплатин (Pharmachemie, Haarlem, Netherlands) в МПД (4 мг/кг); ОЯ ГИПП (n=12) – открытая ГИПП со стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида.

Штамм сингенной карциномы яичника (штамм ОЯ) был получен в результате трансплацентарного канцерогенеза высоких доз 7,12-диметилбензантрацена (ДМБА) [7]. Исходный гистологический тип опухоли – метастазирующая папиллярная аденокарцинома, в настоящее время – асцитная опухоль. Штамм поддерживается на крысах-самках Wistar. На 7–9-й день после внутрибрюшинной перевивки осуществляли забор асцита и трансплантировали экспериментальным животным по 1×10^7 клеток в 0,5 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида в/б на крысу.

Уход и все манипуляции с животными выполнялись в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123) и Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС о защите животных, используемых для научных целей. Протокол был одобрен локальным этическим коми-

тетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Эксперимент был проведен на 36 половозрелых аутбредных крысах-самках Wistar разведения ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область, Россия) с медианой начальной массы тела 295 г (мин-макс 270–385 г). Животные содержались в конвенциональном виварии в полипропиленовых клетках при температуре воздуха 20–24 °С, относительной влажности 50–60 % с 12-часовым циклом светлого/темного времени суток. Крысы получали полнорационный брикетированный комбикорм производства компании «Лабораторкорм» (Москва, Россия) и водопроводную питьевую воду без ограничений.

Экспериментальная установка для ГИПП состояла из роликового перфузионного насоса, термостатируемой водяной бани, резервуара для перфузата, одной приносящей и одной выносящей магистралей, полипропиленовых трубок диаметром 4 мм и переходников для сборки перфузионного контура (рис. 1). Объем перфузата 210 мл, скорость потока перфузата 30 мл/мин, температура в брюшной полости 40,5–41,5 °С, температура водяной бани 47 °С, время перфузии 45 мин. Для равномерного распределения тепла приносящую магистраль устанавливали слева в поддиафрагмальном пространстве, выносящую – в нижней части правого латерального кармана (рис. 2).

Наблюдение за животными-реципиентами осуществляли в течение всего периода жизни. Первичной конечной точкой была оценка ОВ животных в каждой из трех групп. Общая выживаемость



Рис. 2. Техника выполнения открытой ГИПП.

Примечание:
1 – приносящая магистраль; 2 – выносящая магистраль

Fig. 2. Open abdominal HIPEP technique.

Note: 1 – inflow port; 2 – outflow port

Таблица/Table

Результаты определения ИПК по данным аутопсии Results of the PCI calculation according to autopsy data

Исследуемая зона*/ Studied area	ОЯ контроль в/б (n=12)/ Ovarian tumor Control i.p. (n=12)	ОЯ цисплатин в/б (n=12)/ Ovarian tumor cisplatin i.p. (n=12)	ОЯ ГИПП (n=7)/ Ovarian tumor HIPEP (n=7)
Большой сальник/ The greater omentum	3 (3–3)	3 (0–3)	1 (0–3)
Пространство между печенью и диафрагмой/ The space between the liver and the diaphragm	3 (0–3)	3 (0–3)	0 (0–3)
Ворота печени/ The hepatic hilum	3 (0–3)	3 (0–3)	0 (0–3)
Брыжейка/Mesentery	3 (0–3)	2,5 (0–3)	0 (0–3)
Диафрагма/Diaphragm	0 (0–3)	0 (0–0)	0 (0–3)
Яичники/Ovaries	1 (0–3)	2 (0–3)	0 (0–2)
Париетальная брюшина/ Parietal peritoneum	0 (0–2)	0,5 (0–3)	0 (0–3)
Тело и рога матки с парагонадной клетчаткой/ Uterine body and horns paragonadal adipose tissue	2,5 (0–3)	2,5 (1–3)	0 (0–3)
Общий ИПК* ^a / The total peritoneal carcinomatosis index* ^a	14 (2)	14 (2)	5 (2) ^{b,c}
Масса асцита, г [†] / Ascites mass, g [†]	67,4 (19,6–124,5)	96,1 (14,5–206,2)	24,6 (10,7–103,5)
Степень геморрагии асцита ^{†d} / The grade of hemorrhagic ascites ^{†d}	2 (1–3)	2 (2–2)	3 (2–3) ^{e,f}

Примечание: ИПК – индекс перитонеального канцероматоза; 5 крыс из группы ГИПП были исключены из подсчета ИПК; данные представлены в виде: [†] – медианы (мин-макс) и * – среднего (ошибка средней, SEM); ^a – однофакторный ANOVA тест, p=0,0136; ^b – множественное сравнение тестом Тьюки (ОЯ ГИПП vs. ОЯ контроль в/б), adj p=0,0340; ^c – множественное сравнение тестом Тьюки (ОЯ ГИПП vs. ОЯ цисплатин в/б), adj p=0,0185; ^d – тест Краскела – Уоллиса, p=0,0037; ^e – множественное сравнение тестом Данна (ОЯ ГИПП vs. ОЯ контроль в/б), adj p=0,0182; ^f – множественное сравнение тестом Данна (ОЯ ГИПП vs. ОЯ цисплатин в/б), adj p=0,0039.

Note: IPC – index of peritoneal carcinomatosis; 5 rats in the HIPEP group were excluded from the IPC count; data are presented as [†] – median (min-max) and * – mean (error of the mean, SEM); ^a – one-way ANOVA test, p=0,0136; ^b – multiple comparison using the Tukey's test (OC HIPEP vs. OC control i.p.), adj p=0,0340; ^c – multiple comparison using the Tukey's test (OC HIPEP vs. OC cisplatin i.p.), adj h=0,0185; ^d – Kruskal-Wallis test, p=0,0037; ^e – multiple comparison using the Dunn's test (OC HIPEP vs. OC control i.p.), adj p=0,0182; ^f – multiple comparison using the Dunn's test (OC HIPEP vs. OC cisplatin i.p.), adj p=0,0039.

определялась как время со дня перевивки опухоли до дня гибели животного. Павших животных подвергали полной аутопсии. Оценивали ИПК по модифицированной методике, предложенной Y.L. Klaver et al. [8]. После лапаротомии брюшная полость внимательно исследовалась на предмет наличия опухолевых узлов в 8 зонах (таблица). Опухолевый рост в каждой зоне оценивали полуколичественно, где 0 баллов – нет макроскопически видимой опухоли; 1 балл – ограниченный рост опухоли (диаметр опухолевых узлов 1–2 мм); 2 балла – умеренный рост опухоли (диаметр опухолевых узлов 2–4 мм); 3 балла – выраженный рост опухоли (диаметр опухолевых узлов более 4 мм). При наличии множественных узлов в органе выбирали узел с наибольшим диаметром. Сумма баллов всех зон равнялась общему ИПК. Определяли массу асцита в брюшной полости. Степень выраженности геморрагии асцита оценивали с помощью полуколичественной визуальной шкалы, где 0 соответствовал отсутствию геморрагии; 1 – слабая степень геморрагии; 2 – умеренная степень геморрагии; 3 – выраженная степень геморрагии. Оба яичника каждой крысы, а также органы и ткани с макроскопическими признаками ПК подвергали стандартному гистологическому исследованию при световой микроскопии после окраски гематоксилином и эозином. Готовили цитологические мазки асцита и плеврального выпота с окраской по методу Паппенгейма.

Статистический анализ проводился с использованием пакета GraphPad Prism версии 8.0. Размер выборки был рассчитан на основании анализа выживаемости животных в предыдущем разведочном исследовании. Было достаточно по 12 животных в группу, чтобы отклонить нулевую гипотезу, что выживаемость в контрольной группе и группе ГИПП одинакова с мощностью $(1-\beta)$ 80 % и $\alpha=0,05$

[9]. Нормальность распределения проверялась на основании критерия Шапиро–Уилка и графиков квантиль-квантиль (QQ plot). Критерий Левина использовался для оценки равенства дисперсий. Однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с post-hoc тестом Тьюки (Tukey's test) использовался для множественных сравнений нормально распределенных количественных данных. Критерий Краскела–Уоллиса с post-hoc тестом Данна (Dunn's test) был использован для множественных сравнений количественных данных, имевших ненормальное распределение. Все критерии были двусторонними. Различия считались статистически значимыми при $p<0,05$. В случае множественных сравнений приведено скорректированное значение уровня значимости (adj P). Данные по ОВ животных графически представлены в виде кривых Каплана–Мейера. Для сравнения кривых ОВ применяли логранговый критерий. При множественном сравнении ОВ в трех группах использовалась поправка Бонферрони с критическим уровнем значимости $p<0,017$ (0,05/3). Отношение рисков (Hazard Ratio, OR) и границы его 95 % доверительного интервала (ДИ) рассчитывали с помощью регрессионной модели Кокса.

Результаты

Энграфтмент штамма карциномы яичника был около 100 %. Практически все животные трех групп погибли от перевитой опухоли. Лишь 1 из 12 крыс в группе ГИПП погибла от инфекционных осложнений на 32-й день после процедуры. В результате имплантационного распространения опухоли макроскопически наблюдали обширное поражение рогов и тела матки, яичников, парагонадной клетчатки. Большой сальник выглядел набухшим из-за опухолевой инфильтрации. Также определялись множественные узлы в брыжейке

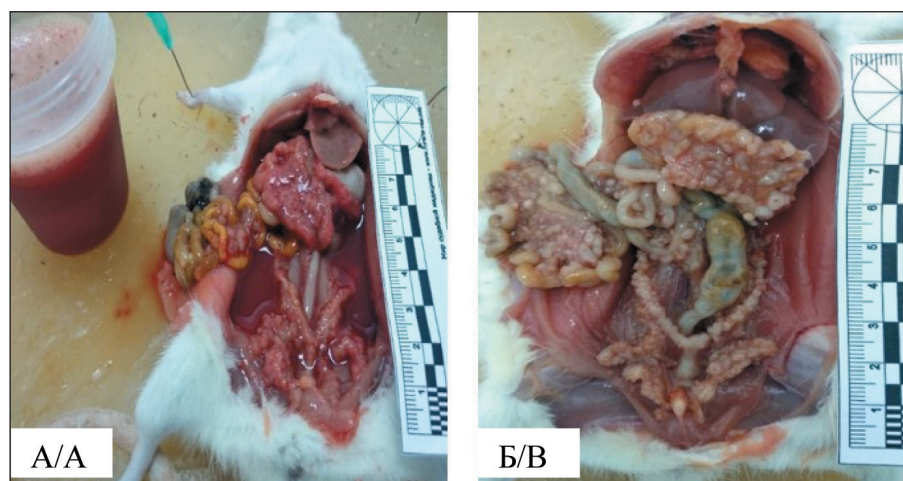


Рис. 3. Макроскопическая картина ПК у крыс с трансплантированной карциномой яичника. Примечание: А – ПК и геморрагический асцит, группа ОЯ цисплатин в/б; Б – множественные опухолевые имплантаты в брыжейке кишечника, в большом сальнике, в рогах и теле матки, в парагонадной клетчатке, асцит эвакуирован, группа ОЯ контроль в/б

Fig. 3. Macroscopic view of the PC in rats with transplanted ovarian carcinoma (OC). Note: A – PC and hemorrhagic ascites, OC cisplatin i.p. group; B – multiple tumor implants in the mesentery, in the greater omentum, in the uterine horns and the body of the uterus, in the paragonadal fat pads, ascites evacuated, OC control i.p. group

кишечника, опухолевые массы в воротах печени, узлы в куполе диафрагмы (рис. 3). Частыми находками на аутопсии были опухолевые конгломераты творожистой консистенции в различных зонах брюшной полости.

При гистологическом исследовании аутопсийного материала во всех образцах тканей крыс обнаруживались поля инвазивной злокачествен-

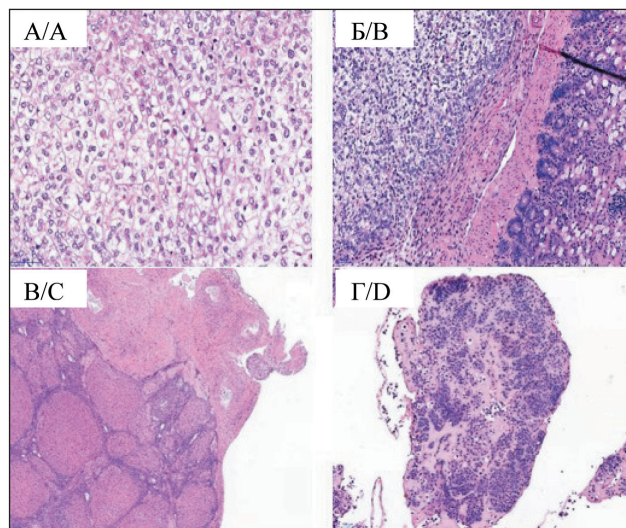


Рис. 4. Микрофото. Опухолевое поражение органов и тканей у крыс с трансплантированной карциномой яичника. Примечание: А – фокус серозной карциномы high-grade, гематоксилин/эозин, $\times 400$; Б – опухоль в серозной оболочке стенки тонкой кишки, гематоксилин/эозин, $\times 200$; В – субтотальное замещение опухолью ткани яичника с инвазией в капсулу, гематоксилин/эозин, $\times 40$; Г – фрагмент большого сальника с инфильтрацией опухолью, гематоксилин/эозин, $\times 40$

Fig. 4. Microphoto. Hystologic images of tumor lesions of organs and tissues in rats with transplanted OC. Note: A – focus of high-grade serous carcinoma, haematoxylin and eosin, $\times 400$; B – tumor in the serosa of small intestine, haematoxylin and eosin, $\times 200$; C – subtotal tumor replacement of ovarian tissue with invasion of the capsule, haematoxylin and eosin, $\times 40$; D – a fragment of the greater omentum with tumor infiltration, haematoxylin and eosin, $\times 40$

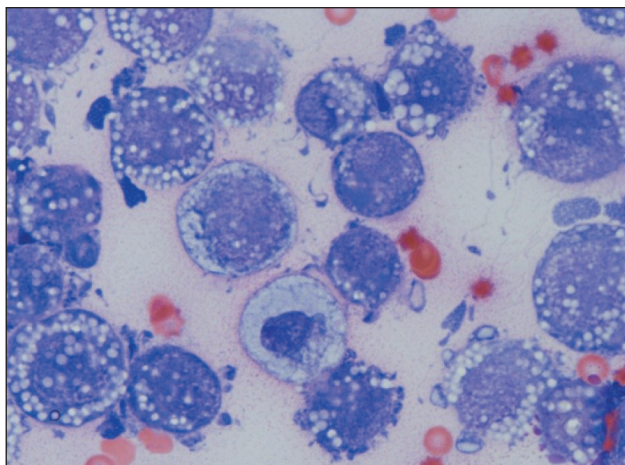


Рис. 5. Мазок асцитической жидкости. Окраска по Паппенгейму, $\times 1000$
Fig. 5. Ascitic fluid smear, Pappenheim's stain, $\times 1000$

ной опухоли папиллярно-солидного строения, состоящей из округлых клеток со скудной эозинофильной или оптически пустой цитоплазмой, с крупными резко атипичными полиморфными ядрами, с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Опухоль инфильтрировала ткань большого сальника, субтотально замещала ткань яичников и распространялась на маточные трубы, матку. Аналогичные множественные фокусы опухоли были в серозной оболочке стенки кишки и брюшине диафрагмы с инвазией в мышечный слой. Данная гистологическая картина характерна для СКВСЗ (рис. 4). В мазках асцитической жидкости определялись обширные поля клеток карциномы high-grade. Клетки полиморфные, резко атипичные с крупными ядрами и ядрышками и высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, дискретно лежащие среди полей клеток моноцитарного ряда (рис. 5).

Интересным наблюдением в группе ГИПП было наличие на аутопсии у 3 из 12 крыс злокачественного плеврального выпота с метастатическим поражением органов грудной полости (легкие, перикард, внутригрудные лимфоузлы) без признаков внутрибрюшинной диссеминации опухоли (рис. 6). Эти животные были исключены из подсчета ИПК.

Медиана ОВ в группе ОЯ контроль в/б, ОЯ цисплатин в/б и ОЯ ГИПП составила 19, 40 и 39 дней на (рис. 7) соответственно (логранговый тест $p < 0,0001$). Статистически значимые различия ОВ в сравнении с контролем наблюдались в группе цисплатина (ОР=0,22; 95 % ДИ 0,08–0,62; логранговый тест $p < 0,0001$) и в группе ГИПП (ОР=0,32; 95 % ДИ 0,13–0,82; логранговый тест $p = 0,0013$). Значимых различий в ОВ между группами цисплатина и ГИПП не было (логранговый тест $p = 0,4853$). В группе ГИПП 1 из 12 крыс оставалась жива на момент окончания наблюдения (138-й день).

В контрольной группе и в группе цисплатина на аутопсии наблюдалось обширное внутрибрюшинное распространение опухоли и поражение половых органов крыс-самок. В группе ГИПП общий ИПК был значимо ниже в сравнении с контрольной группой (adj $p = 0,0340$) и группой цисплатина (adj $p = 0,0185$). Результаты определения общего ИПК в исследуемых группах представлены в таблице. Значимых различий в массе асцита среди экспериментальных групп выявлено не было из-за большой вариабельности этого показателя. Асцитическая жидкость у животных из группы ГИПП имела более выраженную степень геморагии. Влияние экспериментальных воздействий на динамику массы тела животных в течение эксперимента представлено на рис. 8.

Обсуждение

Многообещающей стратегией в лечении больных с ПК при опухолях различной локализации

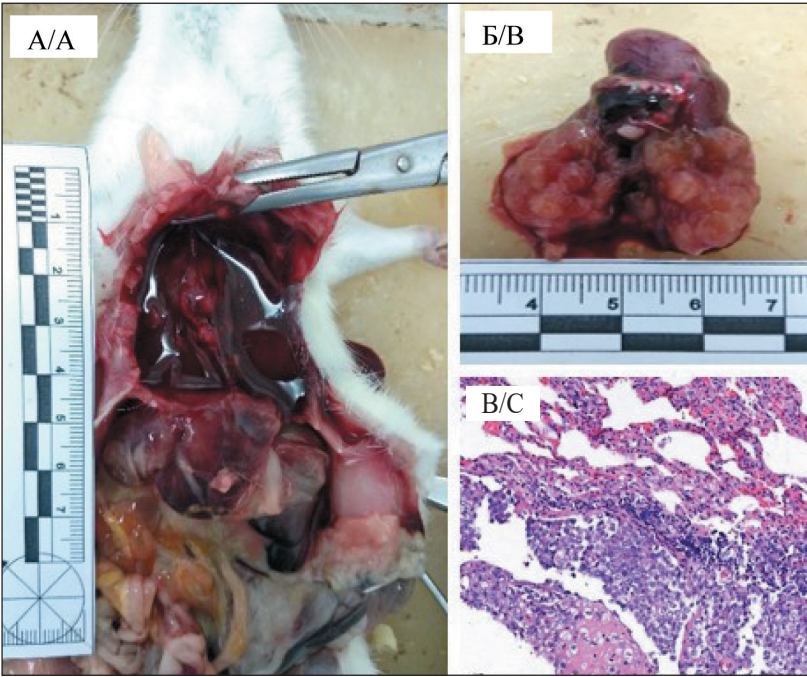


Рис. 6. Изменения в органах грудной полости у крысы из группы ОЯ ГИПП. Примечание: А – геморрагический злокачественный плевральный выпот; Б – опухолевое поражение легких; на рис. В/С – фокус high-grade карциномы в легком, гематоксилин/эозин, $\times 100$
Fig. 6. Malignant lesions in the thoracic cavity in a rat from the OC HIPEP group. Note: А – hemorrhagic malignant pleural effusion; В – pulmonary metastases; С – focus of high-grade carcinoma in the lung, haematoxylin and eosin, $\times 100$

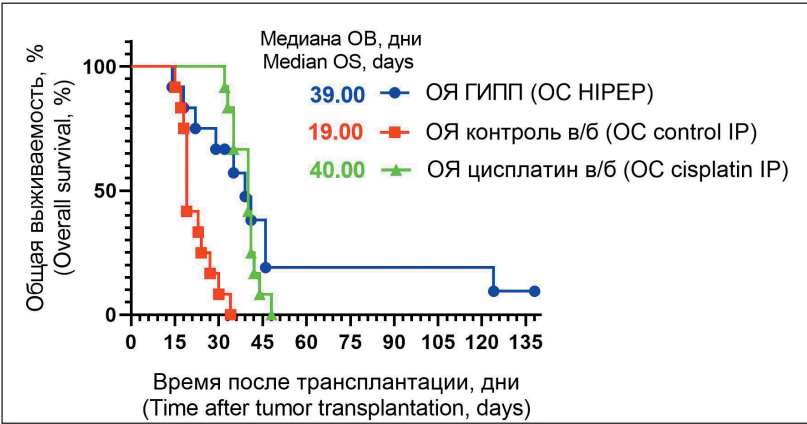


Рис. 7. Влияние экспериментальных воздействий на ОВ крыс с трансплантированной карциномой яичника (Кривые Каплана–Мейера)
Fig. 7. Effect of experimental treatment on OS in rats with transplanted OC (Kaplan–Meier curves)

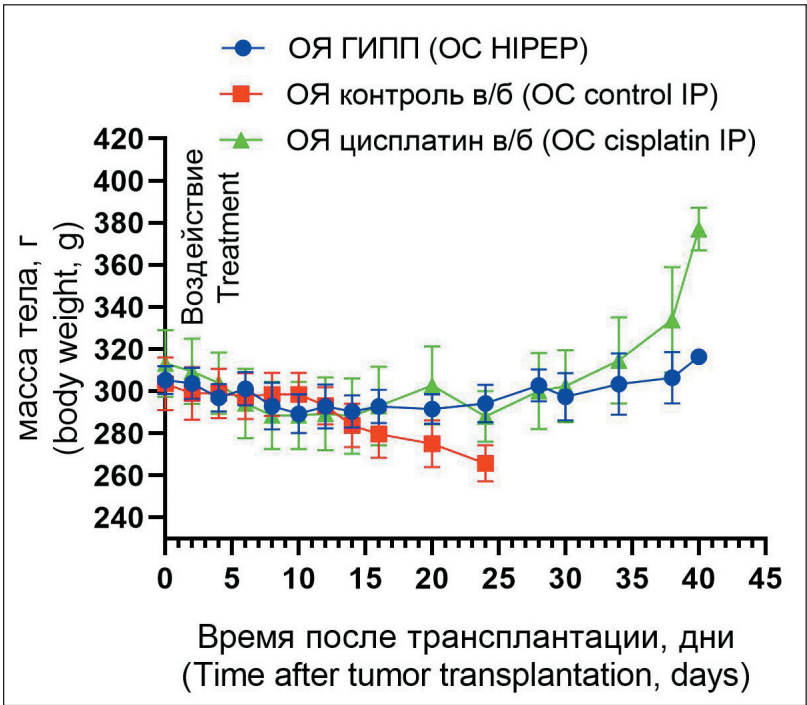


Рис. 8. Динамика массы тела животных в течение эксперимента. Данные представлены в виде среднего (ошибка среднего) минимум трех измерений
Fig. 8. Course of mean body weight during study. Data points represent mean (SEM) of minimum 3 measurements

является сочетание хирургического лечения и внутрибрюшинной лекарственной терапии [10]. Известный синергизм действия регионарной гипертермии и химиотерапевтических агентов стал поводом для широкого изучения и внедрения процедуры НИРЕС в клиническую практику [11]. Тем не менее для первичного ЭРЯ и его рецидивов НИРЕС пока остается экспериментальным методом в крупных центрах. Точный механизм противоопухолевого действия супранормальных температур до конца неизвестен. Цитотоксические эффекты гипертермии многогранны. Они обусловлены повреждением клеточных мембран, ядер, денатурацией белка и изменением проницаемости для ионов кальция. Гипертермия нарушает митотические процессы не только в опухолевых, но и в нормальных клетках. Этот процесс носит транзитный характер. В опухолевых клетках после воздействия гипертермии происходит увеличение количества лизосом и активности лизосомальных ферментов. Микроциркуляция в опухолевой ткани подавляется гипертермией, что приводит к уменьшению кровотока в опухоли или полному ее стазу. В то же время в нормальных тканях, наоборот, кровоток усиливается. Эти эффекты наряду с нарушением процессов клеточного дыхания приводят к накоплению молочной кислоты и закислению микроокружения опухоли, что приводит к увеличению числа и «хрупкости» лизосом, сопровождающейся повышенной гибелью опухолевых клеток. Синтез РНК при воздействии гипертермии подавляется как в нормальных, так и в опухолевых клетках. В меньшей степени подавляется синтез ДНК и белка [6].

В нашем исследовании мы оценили изолированную противоопухолевую активность локальной гипертермии в виде открытой ГИПП и сравнили ее с эффектом нормотермической ВБХТ цисплатином в МПД. Выбранный нами штамм карциномы яичника, трансплантируемый крысам-самкам Wistar, достаточно правдоподобно воспроизводит клиническую ситуацию распространенного ЭРЯ (III–IV стадии) у пациенток с ПК и асцитом. Выбор открытой техники выполнения ГИПП был не случаен. В сравнении с закрытым вариантом перфузии техника «колизия» позволяет добиться равномерного распределения тепла в брюшной полости, обеспечивает лучший контроль распределения перфузата, кроме того, есть постоянный легкий доступ к органам брюшной полости. При открытой перфузии отсутствуют пузыри в контуре, практически не случается «присасывание» органов к выносящей магистрали (если случается, то это легко исправляется), а риск термического повреждения органов и тканей минимален [12, 13]. По сравнению с контрольной группой открытая ГИПП с 0,9 % раствором натрия хлорида значительно увеличила ОВ крыс с распространенной карциномой яичника – с 19 до 39 дней (логранговый

тест $p=0,0013$). Локальная гипертермия на 68 % снижала риск смерти животных с трансплантированной опухолью (ОР=0,32; 95 % ДИ 0,13–0,82). Интересен и «хвостообразный» профиль кривой Каплана–Мейера в группе ГИПП. Наличие таких «хвостов» характерно для кривых ОВ пациентов со злокачественными новообразованиями, получавших чекпойнт-ингибиторы и длительно отвечающих на иммунотерапию. Доля таких больных при монотерапии чекпойнт-ингибиторами, как правило, невелика [14]. Это наблюдение может косвенно свидетельствовать об активации компонентов противоопухолевого иммунитета у иммунокомпетентных животных на фоне гипертермии. Известно, что гипертермия при процедуре НИРЕС стимулирует выработку белков теплового шока (HSPs), презентация которых на поверхности опухолевых клеток активирует противоопухолевый иммунный ответ [15]. Изучение синергизма гипертермии и противоопухолевой иммунотерапии является перспективной и быстро развивающейся областью экспериментальной и клинической онкологии [16].

По данным аутопсии павших животных обций ИПК был достоверно ниже в группе ГИПП в сравнении с контролем и нормотермической ВБХТ цисплатином в МПД (5, 14 и 14 баллов соответственно, однофакторный ANOVA тест $p=0,0136$). Значимых различий в массе асцита среди групп не было. Асцит у животных из группы ГИПП имел более выраженную степень геморагии. Это, вероятно, и стало основной причиной гибели животных в группе ГИПП. Развитие у 3 из 12 животных в группе ГИПП плеврального выпота и опухолевого поражения органов грудной полости без макроскопических признаков в/б распространения опухоли, вероятно, объясняется миграцией опухолевых клеток под действием повышенного давления в брюшной полости и супранормальных температур во время процедуры ГИПП.

Заключение

Локальная гипертермия в виде открытой ГИПП с 0,9 % раствором натрия хлорида значительно увеличивает ОВ животных с распространенной сингенной карциномой яичника, оказывает выраженное терапевтическое воздействие на развитие ПК. По показателю ОВ противоопухолевая активность ГИПП сопоставима с эффектом нормотермической ВБХТ цисплатином в МПД. Разработанная технология выполнения открытой ГИПП в эксперименте и аппаратно-техническое оснащение для перфузионного контура позволяют изучить новые противоопухолевые агенты и рецептуры растворов-носителей для НИРЕС, а также проводить изыскания в области комбинированного воздействия гипертермии и иммунотерапии на опухолевый рост.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [published correction appears in CA Cancer J Clin. 2020 Jul; 70(4): 313]. CA Cancer J Clin. 2018; 68(6): 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
2. Momenimovahed Z., Tiznobaik A., Taheri S., Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. Int J Womens Health. 2019 Apr; 11: 287–99. doi: 10.2147/IJWH.S197604.
3. van Baal J.O.A.M., van Noorden C.J.F., Nieuwland R., Van de Vijver K.K., Sturk A., van Driel W.J., Kenter G.G., Lok C.A.R. Development of Peritoneal Carcinomatosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Review. J Histochem Cytochem. 2018 Feb; 66(2): 67–83. doi: 10.1369/0022155417742897.
4. Helderman R.F.C.P.A., Löke D.R., Kok H.P., Oei A.L., Tanis P.J., Franken N.A.P.K., Crezee J. Variation in Clinical Application of Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy: A Review. Cancers (Basel). 2019 Jan; 11(1): 78. doi: 10.3390/cancers11010078.
5. van Driel W.J., Koole S.N., Sikorska K., Schagen van Leeuwen J.H., Schreuder H.W.R., Hermans R.H.M., de Hingh I.H.J.T., van der Velden J., Arts H.J., Massuger L.F.A.G., Aalbers A.G.J., Verwaal V.J., Kieffer J.M., Van de Vijver K.K., van Tinteren H., Aaronson N.K., Sonke G.S. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. N Engl J Med. 2018 Jan; 378(3): 230–40. doi: 10.1056/NEJMoa1708618.
6. Sticca R.P., Dach B.W. Rationale for hyperthermia with intraoperative intraperitoneal chemotherapy agents. Surg Oncol Clin N Am. 2003 Jul; 12(3): 689–701. doi: 10.1016/s1055-3207(03)00029-2.
7. Погосянц Е.Е., Пригожина Е.Л., Егорова Н.А. Перевиваемая асцитная опухоль яичника крысы (штамм ОЯ). Вопросы онкологии. 1962; 8(11): 29–36. [Pogosyants E.E., Prigozhina E.L., Egorova N.A. Transplantable ascitic ovary tumour of the rat. Problems in Oncology. 1962; 8: 29–36. (in Russian)].
8. Klaver Y.L., Hendriks T., Lomme R.M., Rutten H.J., Bleichrodt R.P., de Hingh I.H. Intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy after cytoreductive surgery for peritoneal carcinomatosis in an experimental model. Br J Surg. 2010 Dec; 97(12): 1874–80. doi: 10.1002/bjs.7249.
9. Schoenfeld D.A., Richter J.R. Nomograms for calculating the number of patients needed for a clinical trial with survival as an endpoint. Biometrics. 1982 Mar; 38(1): 163–70.
10. Goodman M.D., McPartland S., Detelich D., Saif M.W. Chemotherapy for intraperitoneal use: a review of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy and early post-operative intraperitoneal chemotherapy. J Gastrointest Oncol. 2016 Feb; 7(1): 45–57. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.111.
11. Sugarbaker P.H., Graves T., DeBruijn E.A., Cunliffe W.J., Mullins R.E., Hull W.E., Oliff L., Schlag P. Early postoperative intraperitoneal chemotherapy as an adjuvant therapy to surgery for peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer: pharmacological studies. Cancer Res. 1990 Sep; 50(18): 5790–4.
12. González-Moreno S., González-Bayón L.A., Ortega-Pérez G. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: Rationale and technique. World J Gastrointest Oncol. 2010 Feb; 2(2): 68–75. doi: 10.4251/wjgo.v2.i2.68.
13. McCabe-Lankford E., Peterson M., McCarthy B., Brown A.J., Terry B., Galarza-Paez L., Levi-Polyachenko N. Murine Models of Intraperitoneal Perfusion for Disseminated Colorectal Cancer. J Surg Res. 2019 Jan; 233: 310–322. doi: 10.1016/j.jss.2018.07.063.
14. Harris S.J., Brown J., Lopez J., Yap T.A. Immuno-oncology combinations: raising the tail of the survival curve. Cancer Biol Med. 2016 Jun; 13(2): 171–93. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0015.
15. Zunino B., Rubio-Patiño C., Villa E., Meynet O., Proics E., Cornille A., Pommier S., Mondragón L., Chiche J., Bereder J.M., Carles M., Ricci J.E. Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy leads to an anticancer immune response via exposure of cell surface heat shock protein 90. Oncogene. 2016 Jan; 35(2): 261–8. doi: 10.1038/ncr.2015.82.
16. Skitzki J.J., Repasky E.A., Evans S.S. Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer. Curr Opin Investig Drugs. 2009 Jun; 10(6): 550–8.

Поступила/Received 20.11.2020
Принята в печать/Accepted 13.01.2021

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Муразов Ярослав Геннадьевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). E-mail: yaroslav84@yandex.ru. SPIN-код (РИНЦ): 2770-5375. Author ID (Scopus): 53863794000. ORCID: 0000-0002-6573-3112.

Семенов Александр Леонидович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории канцерогенеза и старения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код (РИНЦ): 4301-8679. Researcher ID (WOS): S-1484-2016. Author ID (Scopus): 16307589600. ORCID: 0000-0002-5190-0629.

Сенчик Константин Юрьевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения опухолей мягких тканей и костей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код: 4851-5894. Author ID (Scopus): 55458924100. ORCID: 0000-0002-1341-2085.

Нюганен Анна Олеговна, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код (РИНЦ): 2357-6059. ORCID: 0000-0003-2685-5093.

Артемова Анна Сергеевна, кандидат медицинских наук, заведующая патологоанатомическим отделением, руководитель научной лаборатории морфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код (РИНЦ): 5760-5463. Author ID (Scopus): 46760987700. ORCID: 0000-0002-2948-397X.

Беляев Алексей Михайлович, доктор медицинских наук, директор ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код (РИНЦ): 9445-9473. Researcher ID (WOS): K-1954-2017. Author ID (Scopus): 54995489300. ORCID: 0000-0001-5580-4821.

ВКЛАД АВТОРОВ

Муразов Ярослав Геннадьевич: разработка дизайна исследования, выполнение исследования, обработка результатов, написание и редактирование текста статьи.

Семенов Александр Леонидович: выполнение исследования, обработка результатов, написание и редактирование текста статьи.

Сенчик Константин Юрьевич: сборка перфузионного контура, редактирование текста статьи.

Нюганен Анна Олеговна: подготовка и гистологическое исследование аутопсийного материала, написание и редактирование текста статьи.

Артемова Анна Сергеевна: гистологическое исследование аутопсийного материала, редактирование текста статьи.

Беляев Алексей Михайлович: критические замечания, редактирование текста статьи.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Yaroslav G. Murazov, PhD, Laboratory of Cancer Chemoprevention and Pharmacology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (St-Petersburg, Russia). E-mail: yaroslav84@yandex.ru. SPIN-code: 2770-5375. Author ID (Scopus): 53863794000. ORCID: 0000-0002-6573-3112.

Alexandr L. Semenov, MD, PhD, Senior Researcher, Carcinogenesis Laboratory, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (St-Petersburg, Russia). SPIN-код (РИНЦ): 4301-8679. Researcher ID (WOS): S-1484-2016. Author ID (Scopus): 16307589600. ORCID: 0000-0002-5190-0629.

Konstantin Yu. Senchik, MD, DSc, Leading Researcher, Department of Soft Tissues and Bones, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (St-Petersburg, Russia). SPIN-код: 4851-5894. Author ID (Scopus): 55458924100. ORCID: 0000-0002-1341-2085.

Anna O. Nyuganen, MD, Pathologist, Pathology Department, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (St-Petersburg, Russia). SPIN-код (РИНЦ): 2357-6059. ORCID: 0000-0003-2685-5093.

Anna S. Artemyeva, MD, PhD, Head of Pathology Department, Head of Tumor Morphology Department, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (St-Petersburg, Russia). SPIN-код (РИНЦ): 5760-5463. Author ID (Scopus): 46760987700. ORCID: 0000-0002-2948-397X.

Alexey M. Belyaev, MD, DSc, Director of N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (St-Petersburg, Russia). SPIN-код (РИНЦ): 9445-9473. Researcher ID (WOS): K-1954-2017. Author ID (Scopus): 54995489300. ORCID: 0000-0001-5580-4821.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Yaroslav G. Murazov: study design, experimental data collection, results processing, writing and editing of the manuscript.

Alexandr L. Semenov: experimental data collecting, results processing, writing and editing of the manuscript.

Konstantin Yu. Senchik: assembling the perfusion circuit, editing of the manuscript.

Anna O. Niuganen: processing and histological examination of autopsy material, writing and editing of the manuscript.

Anna S. Artemyeva: histological examination of autopsy material, editing of the manuscript.

Alexey M. Belyaev: critical revision of the article, editing of the manuscript.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.