

УДК 616.62-006.6:[615.277.3 + 615.849.11]-036.87

НЕКОТОРЫЕ БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ОПТИМИЗАЦИИ ВНУТРИПУЗЫРНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СКАНИРУЮЩЕГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Шихлярова А.И., Тарнопольская О.В., Шевченко А.Н., Филатова Е.В.,
Куркина Т.А., Селезнев С.Г., Швырев Д.А., Хомутенко И.А., Тараканов М.В.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
Ростов-на-Дону, e-mail: rnoi@list.ru

Эксперименты *in vitro* с изолированными клетками рака мочевого пузыря позволили сделать вывод о существенном накоплении катионов-флуорохромов и цитостатика гемцитабина при условии их омагничивания в режимах сканирования частоты от 1 до 150 Гц, магнитной индукцией 20 мТ. На основании этих испытаний применили магнитотерапию к большим неинвазивным раком мочевого пузыря, получающим адьювантную внутрипузырную химиотерапию гемцитабином. Выявлено положительное воздействие магнитного поля на увеличение биодоступности химиопрепарата в клетки опухоли, это подтверждено положительными результатами в клинических испытаниях на 30 больных, которые получали воздействие аппаратом «Градиент-4М» во время проведения внутрипузырной химиотерапии гемцитабином. Получено увеличение безрецидивного периода у 100% пациентов основной группы до 17 ± 2 месяцев против 6 ± 2 месяцев ($p = 0,046$) в контрольной группе, где рецидивы отмечены у 15% больных.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, гемцитабин, сканирующее магнитное поле, рецидивы

SOME BIOPHYSICAL MECHANISMS OPTIMIZATION INTRAVESICAL CHEMOTHERAPY FOR BLADDER CANCER UNDER THE INFLUENCE OF MAGNETIC FIELD SCANNING

Shikhlyarova A.I., Tarnopolskaya O.V., Shevchenko A.N., Filatova E.V., Kurkina T.A.,
Seleznyov S.G., Shvyryov D.A., Khomutenko I.A., Tarakanov M.V.

Rostov Research Oncologic Institute Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don, e-mail: rnoi@list.ru

In vitro experiments with isolated bladder cancer cells led to the conclusion of a significant accumulation of cations fluorochromes and cytostatic gemcitabine provided their magnetization modes scanning frequency from 1 to 150 Hz, the magnetic flux density of 20 mT. On the basis of these tests applied magnetic therapy to patients with non-invasive bladder cancer receiving adjuvant intravesical chemotherapy gemcitabine. A positive influence of a magnetic field to increase the bioavailability of chemotherapy to the tumor cells, it has been confirmed positive results in clinical trials on 30 patients who received exposure apparatus «Gradient-4M» during intravesical chemotherapy gemcitabine. Obtained by increasing the disease-free interval in 100% of the study group patients and 17 ± 2 months vs. 6 ± 2 months ($p = 0,046$) in the control group, where recurrences were observed in 15% of patients.

Keywords: bladder cancer, gemcitabine, scanning magnetic field recurrences

К одним из насущных проблем лечения неинвазивного рака мочевого пузыря (НРМП) относится снижение частоты рецидивирования, выявляемого у 80% пациентов, а также уменьшение более чем у 20% вероятности прогрессирования процесса. Известно, что почти у 50% больных НРМП рецидив развивается в течение первых двух лет с момента проведения трансуретральной резекции (ТУР), начиная со сроков 4–6 месяцев [1, 3]. Для предотвращения такого нежелательного течения НРМП разработана адьювантная внутрипузырная химиотерапия (ВПХТ) [5]. Высокую противорецидивную эффективность демонстрирует противоопухолевый препарат гемцитабин, оказывающий влияние на опухолевые клетки, но при этом не вызывая выраженного токсического действия на нормальную ткань мочевого пузыря, гемодинамику и самочувствие пациентов [6]. По сравнению

с другими вариантами противорецидивной терапии (иммунотерапия БЦЖ) гемцитабин проявляет сходное по эффективности действие, однако не ликвидирует проблему возникновения рецидивов полностью [6]. В связи с этим в онкоурологии наметился путь к повышению результативности ВПХТ через механизмы воздействия различных физических факторов, повышающих эффект проникновения химиопрепаратов в опухолевые клетки. Действительно, вероятность наличия опухолевых клеток после ТУР обуславливается диффузным характером неопластических изменений уротелия, наличием рак *in situ* (CIS), возможностью имплантации опухолевых клеток во время операции. Чтобы усилить избирательное действие химиопрепарата применяется СВЧ-гипертермия [10], электромагнитные излучения оптического диапазона – лазер, сонотерапия и фотодинамическая тера-

пия [9]. В диапазоне сверхнизкочастотных магнитных полей особенно эффективным проявился режим сканирования частот (СКМП), воспроизводимый с помощью микропроцессорного магнитотерапевтического аппарата «Градиент-4М» [4]. Также воздействие на экспериментальные модели опухолей *in vitro* и *in vivo* способствовало значительному проникновению вглубь опухолевых клеток цисплатина и доксорубина, а также потенциалочувствительных зондов аниона АНС и катиона ДСМ. Причем катионы – ДСМ и доксорубин накапливались в опухолевых клетках из омагниченных опухолей в среднем в 2–4 раза больше, чем в клетках без воздействия СКМП. Авторы объясняют это увеличение содержания цитостатиков-катионов и флуорохромов-катионов в клетках изменением барьерных свойств мембран опухолевых клеток под действием СКМП. Основным барьером для проникновения в клетку заряженной молекулы химиопрепарата является величина электрических параметров поверхности клетки, таких как ее мембранный потенциал и электрический заряд поверхности. Взаимодействие электромагнитного поля и любого проникающего иона с клеткой также определяется ее электрическими характеристиками, основным из них является средний мембранный потенциал, как управляющий параметр [2]. Можно предположить, что одним из биофизических механизмов повышения биодоступности цитостатиков в опухолевые клетки при НРМП является эффективное электромагнитное воздействие, обеспечивающее регуляторную роль мембранного потенциала с учетом его влияния на процессы пролиферации, дифференцировки, миграции, поляризации, частоты деления клеток.

Целью работы на первом этапе являлась проверка в опытах на изолированных клетках *in vitro* увеличения содержания гемцитабина в удаленной опухоли НРМП при воздействии на нее СКМП. Целью на втором, клиническом этапе исследования, явилось снижение уровня рецидивирования у больных НРМП, подвергнутых воздействию сканирующих магнитных полей в процессе адьювантной ВПХТ.

Материалы и методы исследования

Исследования *in vitro* проводили на 36 образцах ткани опухоли, полученных после проведения ТУР больным НРМП. В каждом конкретном случае получено добровольное согласие больных на использование ткани в научных исследованиях. Из кусочка опухоли готовили препараты для микроскопирования, методика этого процесса подробно описана в работах [7, 8, 2]. Использовали метод флуоресцентных зондов: клетки прижизненно окра-

шивали потенциалозависимыми флуорохромами и исследовали под люминесцентным микроскопом «Axio Imager.M2», Zeiss. Микросъемку осуществляли при максимальном увеличении (x1000) цветной цифровой камерой Axio Cam HR. Применяли флуоресцентные потенциалозависимые зонды анион АНС (1 – анилинафталин-8-сульфонат) и катион ДСМ (4-(*n*-диметиламиностирил)-1- метилпиридиний). Цитостатики: гемцитабин (концентрация 4 мг/мл). Длина волны возбуждения для АНС была 375 нм, для ДСМ 480 нм, длина волн эмиссии для АНС – 450 нм, а для ДСМ – 520 нм. Конечная концентрация АНС в препарате составляла 40 мкМ, ДСМ – 20 мкМ. Использовали модуль захвата изображения «MosaiX», выбирали 5 колонок и 5 рядов, получали 25 кадров цифровых изображений. Измерения проводили интерактивно, измеряя в среднем от 200 до 400 клеток опухоли. АНС был поставлен фирмой «Serva», а флуорохром ДСМ был синтезирован в НИИ физической и органической химии при ЮФУ. При микросъемке клеток во всех пробах соблюдали одинаковое разрешение и одну и ту же экспозицию съемки. Данные измерений сохраняли в приложении AxioVision, rel.4.8 в файле, совместимом с Excel (Microsoft Office-2003), которые затем сводили в общие электронные таблицы и обрабатывали в Excel. Яркость клеток суммировали по трем цветовым каналам (RGB). Рассчитывали статистические параметрические показатели: среднее, стандартное отклонение, использовали *t*-test Стьюдента и непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни для оценки уровня значимости различий. Определяли отношения средних яркостей клеток в исходной среде (без воздействия) к показателям клеток с воздействием: присутствием в среде гемцитабина и гемцитабин плюс омагничивание СКМП. Время инкубации с гемцитабином составляло 30–60 мин.

Клеточную взвесь каждого образца (концентрацию клеточной взвеси в каждом препарате доводили до $7 \pm 2 \cdot 1000$ /мкл) опухоли делили на 6 частей, половина из которых витально окрашивали липофильным флуоресцентным зондом катионом ДСМ в концентрации 20 мкМ и инкубировали при температуре 22–25°C в разных вариантах: 1 – с гемцитабином, 2 – после воздействия на клеточную взвесь гемцитабина СКМП, 3 – без воздействий (фон). Аналогичный алгоритм был применен при витальном окрашивании зондом анионом АНС, в концентрации 40 мкМ. На рис. 1 представлены структурные формулы флуоресцентных зондов, доксорубина и гемцитабина и потенциалозависимого зонда-катиона ДСМ.

В исследование *in vivo* включены 60 больных НРМП, которые после ТУР и гистологической верификации уротелиального рака вошли в группу промежуточного риска развития рецидива заболевания. Все пациенты получали адьювантную ВПХТ через уретральный катетер 2000 мг растворенного в 50 мл физиологического раствора гемцитабина (в концентрации 40 мг/мл), одно введение в неделю, всего шесть введений. В основной группе больных ($n = 30$) одновременно с ВПХТ воздействовали на область проекции мочевого пузыря СКМП индукцией 10 мГл со сканированием частоты сигнала от 1 до 150 Гц, экспозицией 10 минут. Генератором электромагнитного сигнала служил отечественный магнитотерапевтический прибор «Градиент-4М» со встроенной микропроцессорной техникой (ООО Научно-производственная фирма «Пульс», г. Ростов-на-Дону) [4]. Между парными индукторами СКМП устанавливали

индуктор, создающий постоянное магнитное поле (ПМП) с магнитной индукцией 20 мТл. После окончания процедуры пациент продолжал экспозицию омагниченного раствора химиопрепарата, лежа на спине, животе, левом и правом боку по 15 минут, всего 60 минут. Каждые три месяца после хирургическо-

го лечения проводилось комплексное обследование, включая УЗИ органов брюшной полости и малого таза, цитологическое исследование мочи, при необходимости томограмма органов малого таза и цистоскопию для выявления признаков рецидива и прогрессирования заболевания.

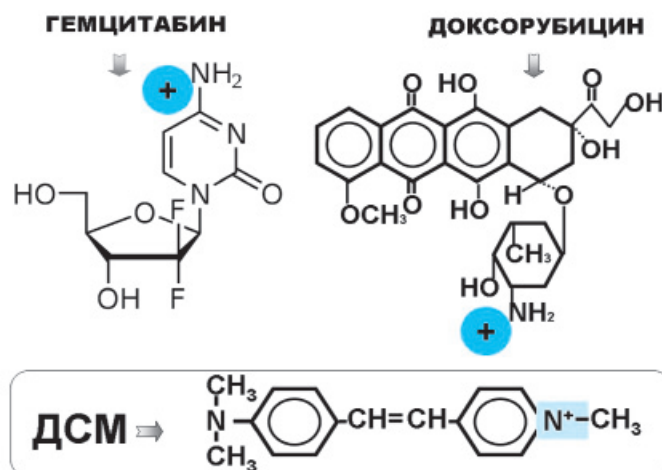


Рис. 1. Структурные формулы используемых зондов-катионов

Результаты исследования и их обсуждение

Изучение флуоресцентной морфологии изолированных живых клеток НРМП и измерение яркостей флуоресценции клеток показало, что гемцитабин изменяет их мембранный потенциал, а именно деполяризует мембрану. Во-первых, следует подтвердить цитотоксическое действие гемцитабина, отмеченное нами в окраске анионом АНС: мертвые клетки ярко окрашивали ядра, и таких клеток было в два раза больше, чем в препарате без гемцитабина. Еще больше, в 5 раз, их было тогда, когда эти клетки были омагничены. Во-вторых: средний мембранный потенциал клеток опухоли с гемцитабином был в $2,2 \pm 0,5$ раза меньше, чем у интактных клеток. Этот вывод подтверждался при окраске двумя потенциалозависимыми зондами как АНС, так и ДСМ. Данные представлены в таблице. Можно сделать уверенный вывод, что гемцитабин в терапевтической дозе в два раза активнее деполяризует мембраны опухолевых клеток относительно фона в реализации своего цитотоксического эффекта. В отличие от доксорубина, молекула которого также имеет положительно заряженную группу NH_2 , как молекула гемцитабина (рис. 1), гемцитабин не является флуорохромом. Поэтому о его повышенном проникновении в клетки опухоли можем судить косвенно. О повышенном его накоплении в опухолевых клетках свидетельствуют ана-

логичные эксперименты с доксорубицином и ДСМ, описанные в работе [7], в которой показано, что эти катионы под действием СКМП в 2–4 раза более накапливались в клетках опухоли.

Клеточную взвесь мы окрашивали доксорубицином так же как и в работе [8], клетки показаны на рис. 2. Но данные по измерению яркости доксорубина не вошли в таблицу, поскольку почти все клетки были погибшими при добавлении гемцитабина и действия СКМП.

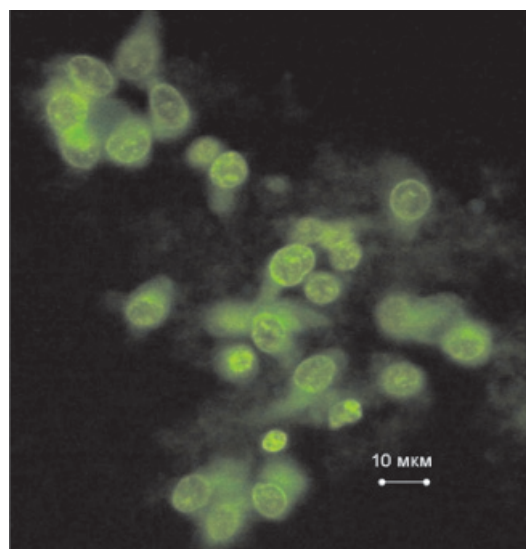


Рис. 2. Клетки рака мочевого пузыря в окраске доксорубицином

В опытных образцах взвеси опухолевых клеток НРМП можно было оценить эффект сочетанного воздействия гемцитабина и СКМП по массовой клеточной деструкции, регистрируемой визуально в полях зрения. На рис. 3 показаны поля зрения с клетками НРМП, окрашенных ДСМ. В них можно видеть зеленую цитоплазму, желто-бурые ядра. Имела место неоднородность клеток по яркости свечения. Сопоставляя показатели средней яркости свечения клеток опухоли, связавших флуорохром-катион ДСМ, можно видеть, что максимальная яркость наблюдаются в исходном состоянии –

без воздействия. По сравнению с фоном флуоресценция клеток при добавлении во взвесь гемцитабина уменьшается в 1,8 раз, а при сочетании гемцитабина и СКМП – уменьшается в 2,3 раза. Это свидетельствует о деполаризующем влиянии цитостатика и омагничивания на мембраны опухолевых клеток. Показатели яркости аниона АНС в клетках только подтверждают этот результат, поскольку деполаризация мембраны клеток, окрашенных АНС, сопровождается увеличением яркости. На рис. 3, а и б показаны поля зрения клеток, окрашенных АНС и ДСМ.

Яркость флуоресценции потенциалозависимых флуорохромов, связанных с живыми опухолевыми клетками и доля погибших клеток

Флуорохром	Показатели ± ст.откл.	Состояние клеточной взвеси			
		Интактная клеточная взвесь	Взвесь с гемцитабином	Клетки сначала омагничены СКМП, затем добавлен гемцитабин	К взвеси сначала добавлен гемцитабин, затем СКМП
АНС	Вг-яркость, отн. ед.	306 ± 30*	670 ± 35*	706 ± 40	800 ± 32
	Доля мертвых клеток, %	6 ± 4	12 ± 6	20 ± 5	22 ± 6
ДСМ	Вг-яркость, отн. ед.	46 ± 6**	26 ± 4**	20 ± 3	18 ± 5
	Доля мертвых клеток, %	7 ± 6	20 ± 6	29 ± 8	30 ± 6

Примечание. Обозначения * и ** – указывают, что различия статистически значимы, $p < 0,01$.

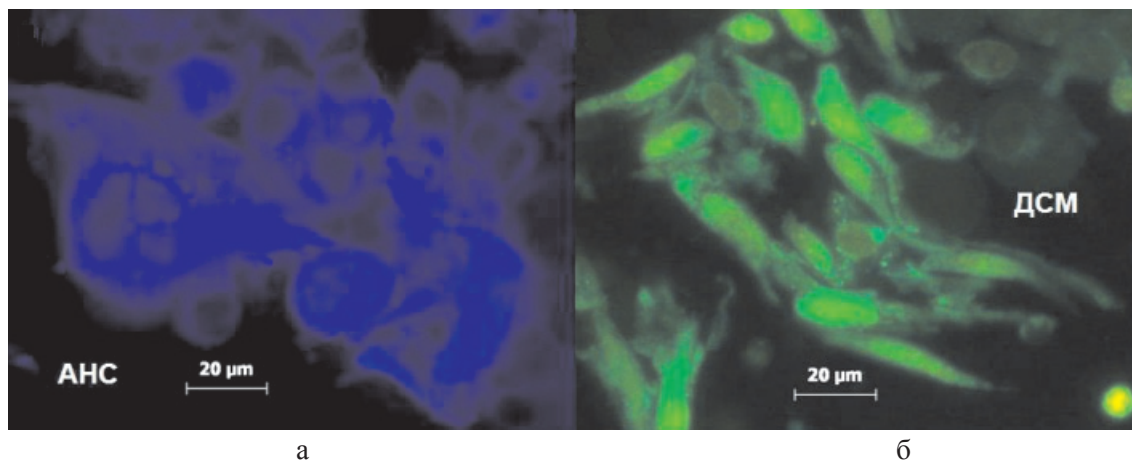


Рис. 3. Клетки рака мочевого пузыря в окраске АНС и ДСМ

Результаты клинических исследований подтвердили предположение об усилении биодоступности химиопрепарата гемцитабина при адьювантном лечении во время проведения внутривезикулярной контактной химиотерапии гемцитабином в сочетании с СКМП. Это выразилось в увеличении без-

рецидивного периода и уменьшении числа рецидивов в группах сравнения. Так, получено значительное увеличение безрецидивного периода до 17 ± 2 месяцев у 100% пациентов основной группы, против 6 ± 2 месяцев ($p = 0,046$), у $15 \pm 3\%$ ($p = 0,022$) больных в контроле с выявленными рецидивами.

Выводы

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о положительном клиническом эффекте применения СКМП в адьювантном лечении ВКХТ больных НРМП. Этот эффект, по-нашему мнению, заключался в увеличенной биодоступности гемцитабина, как заряженной молекуле-катионе, на которую в первую очередь воздействует приложенное электромагнитное воздействие. Опыты *in vitro* с изолированными клетками опухоли доказали изменение проницаемости мембран клеток при взаимодействии с гемцитабином.

Список литературы

1. Клиническая онкоурология / под ред. Б.П. Матвеева. – М., 2003.
2. Максимов Г.К., Тарнопольская О.В., Шихлярова А.И., Непомнящая Е.М., Сергань В.А. Неоднородность клеток эпителия пунктата аденокарциномы предстательной железы по мембранному потенциалу // Вестник Южного научного центра РАН. – 2012. – Т. 8. – № 3.
3. Носов А.К., Воробьев А.В. Адьювантная терапия в онкоурологии // Практическая онкология. – СПб., 2007. – Т.8, № 3.
4. Патент на полезную модель № 98925 Российская федерация. Аппарат для низкочастотной магнитотерапии «Градиент-4М» (правообладатель ООО «НПФ «Пульс»)
5. Русаков И.Г., Быстров А.А., Теплов А.А., Перепечин Д.В. Адьювантная внутривезикулярная химиотерапия поверхностного рака мочевого пузыря // Онкоурология. – 2007. – № 3. – С. 43–45.
6. Серегин И.В., Самойленко В.М. Гемцитабин в лечении рака мочевого пузыря без инвазии мышечной оболочки // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – М., 2009. – т.20, № 4.
7. Шихлярова А.И., Тарнопольская О.В., Куркина Т.А., Резинькова И.А., Шевченко А.Н., Филатова Е.В. Особенности накопления флуорохромов АНС, ДСМ и доксорубина в клетках саркомы 45 крыс при действии на опухоль *in vivo* магнитным полем // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2013. – Т.7, № 3. – С. 44–48.
8. Шихлярова А.И., Тарнопольская О.В., Францианц Е.М., Шевченко А.Н., Филатова Е.В., Куркина Т.А., Резинькова И.А. О влиянии сканирующего магнитного поля на проницаемость мембран опухолевых клеток в эксперименте // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – № 8. – С. 120–125.
9. Di Stasi S., Giannantoni A., Stephen R. et al. Intravesical electromotive mitomycin c versus passive transport mitomycin C for high risk superficial bladder cancer: a prospective randomized study // J. Uro. – 2003. – Vol. 170. – P. 777–782.
10. Van der Heijden A.G., Kiemeny L.A., Gofrit O.N., et al. Preliminary European results of local microwave hyperthermia and chemotherapy treatment in intermediate or high risk superficial transitional cell carcinoma of the bladder // Eur Urol. – 2004. – № 46. – P. 65–71. – discussion 72.