

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ АДЪЮВАНТНОГО РЕЖИМА ВНУТРИБРЮШИННОЙ ХИМИОГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ ПЕРФУЗИИ В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕННЫМ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Беляев А.М., Захаренко А.А., Кондрацов С.А., Суров Д.А., Бабков О.В., Кулешов А.А.

Клиника неотложной онкологии (руководитель – к.м.н. А.А. Захаренко)

НИИ СП им. И.И. Джанелидзе, г. Санкт-Петербург, ул. Будапештская, д.3.

Кондрацов Сергей Александрович 8 (911) 233 12 58; e-mail: kondracov@mail.ru

Резюме: В статье представлены результаты собственных исследований по обоснованию адъювантного режима интраоперационной внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии в комплексном лечении осложненного колоректального рака. Экспериментальным путем доказано, что оптимальным режимом выполнения адъювантной интраоперационной внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии оказалась экспозиция 45 минут при температуре перфузата 43°C. Медиана (Me) пролиферативной активности опухолевых клеток на 2 день эксперимента, составила 0,09; медиана апоптотической активности – 0,86.

Ключевые слова: колоректальный рак, эксперимент, карциноматоз брюшины, свободные опухолевые клетки.

EXPERIMENTAL RATIONALE ADJUVANT HYPERTHERMIC INTRAPERITONEAL CHEMOTHERAPY IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH COMPLICATED COLORECTAL CANCER

Belayev A.M., Zakharenko A.A., Kondratsov S.A., Surov D.A., Babkov O.V., Kuleshov A.A.

Djanelidze Research Institute of Emergency Medicine, Saint Petersburg, Russia

Abstract: The paper presents the results of their research to substantiate the adjuvant treatment of intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in treatment of complicated colorectal cancer. The experimental way prove that the optimal mode of execution of adjuvant intraoperative intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion was exposure for 45 minutes at a temperature of perfusate 43°C. The median (Me) proliferative activity of tumor cells on day 2 of the experiment, was 0.09, the median apoptotic activity - 0.86.

Key words: colorectal cancer, experiment, peritoneal carcinomatosis, free tumor cells.

Актуальность.

Колоректальный рак в настоящее время является одной из наиболее распространенных злокачественных опухолей, занимая третье место в мире в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями. При этом анализ публикаций последних лет свидетельствует о неуклонной тенденции к росту заболеваемости раком данной локализации во всем мире. В структуре летальности от злокачественных новообразований колоректальный рак занимает третье место после опухолей легкого и желудка [1,2].

Несмотря на выраженность клинических признаков и технические возможности диагностики, такие факторы, как длительное бессимптомное течение, недостаточная онкологическая настороженность и поздняя диагностика являются причинами того, что до 85% больных попадают в стационар с осложненными формами заболевания и впервые обращаются не к онкологу, а к общему хирургу [3,4]. Одним из наиболее частых и тяжелых осложнений колоректального рака является острая кишечная непроходимость, частота ее колеблется от 30 до 76,8% [5,6]. По данным отделения неотложной онкологии НИИ СП им. И.И. Джанелидзе структура осложнений при колоректальном раке выглядит следующим образом: чаще всего встречаются острая кишечная непроходимость (50%), реже опухоль осложняется кровотечением (18%), перифокальным воспалением и/или абсцедированием (11%), перфорацией (5%) [7].

Частота встречаемости карциноматоза брюшины во время впервые выполненного оперативного лечения по поводу рака толстой кишки составляет в среднем 7%. Прогрессирование заболевания в виде карциноматоза брюшины после радикальных операций встречается у 4-19% пациентов. В случае местного рецидива колоректального рака карциноматоз брюшины выявляют более чем в 44% наблюдений [8]. При этом анализ статистических данных показывает, что пациенты с осложненными формами рака толстой кишки подвергаются гораздо более высокому риску развития карциноматоза брюшины. Примерно у 55% из этих пациентов будет развиваться карциноматоз брюшины в послеоперационном периоде [9].

По данным различных авторов частота выявления свободных опухолевых клеток (перитонеальная диссеминация) во время радикальной операции при впервые выявленном колоректальном раке широко варьирует и составляет от 3% до 28%, что объясняется различными методами обнаружения атипичных клеток, а так же временем забора материала

(до или после резекции опухоли) [8]. По данным S. Fujii et al. (2009), которые выполняли смывы с поверхности брюшины до резекционного этапа операции пациентам, оперированным по поводу не осложненного колоректального рака, частота выявления свободных опухолевых клеток составляет 6% [10].

До настоящего времени остается нерешенным вопрос выбора адекватного температурно-временного режима в тех случаях, когда мишенью адьювантного химиогипертермического воздействия являются микроскопические очаги опухолевого роста или свободные опухолевые клетки [11,12].

Существующие экспериментальные исследования говорят о возможности снижения тепловой дозы при воздействии на свободные опухолевые клетки и микроскопические очаги опухолевого поражения по брюшине [13,14]. Адекватное снижение температуры или времени перфузии без ущерба для эффективности методики может оказать благотворное влияние на ее безопасность и соответственно расширить применение адьювантной интраоперационной внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии, в частности внедрить ее применение в ургентную хирургию с целью лечения осложненных опухолей толстой кишки.

Цель и задачи исследования.

Целью исследования является экспериментальное обоснование адьювантного режима внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии при лечении больных с осложненными формами рака толстой кишки с повышенным риском развития карциноматоза брюшины.

Исходя из этой цели, были сформулированы следующие задачи исследования.

1. С помощью иммуноцитохимического метода выполнить оценку биологической модели для выполнения внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии в эксперименте.
2. Выполнить серию экспериментов по проведению внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии в различных температурно-временных режимах.
3. Оценить уровень пролиферативной активности и активности апоптоза опухолевых клеток в различных температурно-временных режимах после выполнения внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии в эксперименте.
4. Определить наиболее «мягкий», но эффективный температурно-временной режим для проведения адьювантной интраоперационной внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии больным с осложненными формами рака толстой кишки.

Материалы и методы исследования.

Исследование выполнено на базе клиники неотложной онкологии НИИ СП им. И.И. Джанелидзе, патологоморфологического отделения 122 Клинической больницы Санкт-Петербурга им. Л.Г. Соколова.

С целью экспериментальной оценки температурно-временных режимов внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии использовалась асцитическая жидкость больных раком толстой кишки, в которой при иммуноцитохимическом исследовании выявлены опухолевые клетки. Данная модель предполагает возможность исследовать эффективность различных температурно-временных режимов химиогипертермического воздействия на свободные опухолевые клетки колоректального рака, находящиеся в естественной для них среде [15].

Проведено исследование асцитической жидкости 15 больных раком толстой кишки. В период исследования асцитическая жидкость хранилась в термостате при температуре 37°C. Во всех случаях при иммуно-цитохимическом исследовании определяли негативную реакцию на ERCC-1, что указывало на наличие чувствительности к препаратам платины.

Асцитическую жидкость в стеклянных флаконах по 200 мл нагревали в лабораторной водяной бане «ЛАБ-ТЖ-ТБ-01/12Ц» при температуре 43 и 45°C в течение 30 и 45 минут. Сразу после достижения установленной температуры в асцитическую жидкость добавляли цисплатин в дозировке 0,045 мг на 1 мл раствора.

С целью прекращения влияния цитостатика на свободные опухолевые клетки после окончания химиогипертермического воздействия цисплатин из исследуемой асцитической жидкости удалялся. С этой целью использовалось устройство, позволяющее осуществлять ультрафильтрацию и фильтрацию асцитической жидкости (Кошелев Т.Е., 2010). Схема устройства представлена на рис. 1.

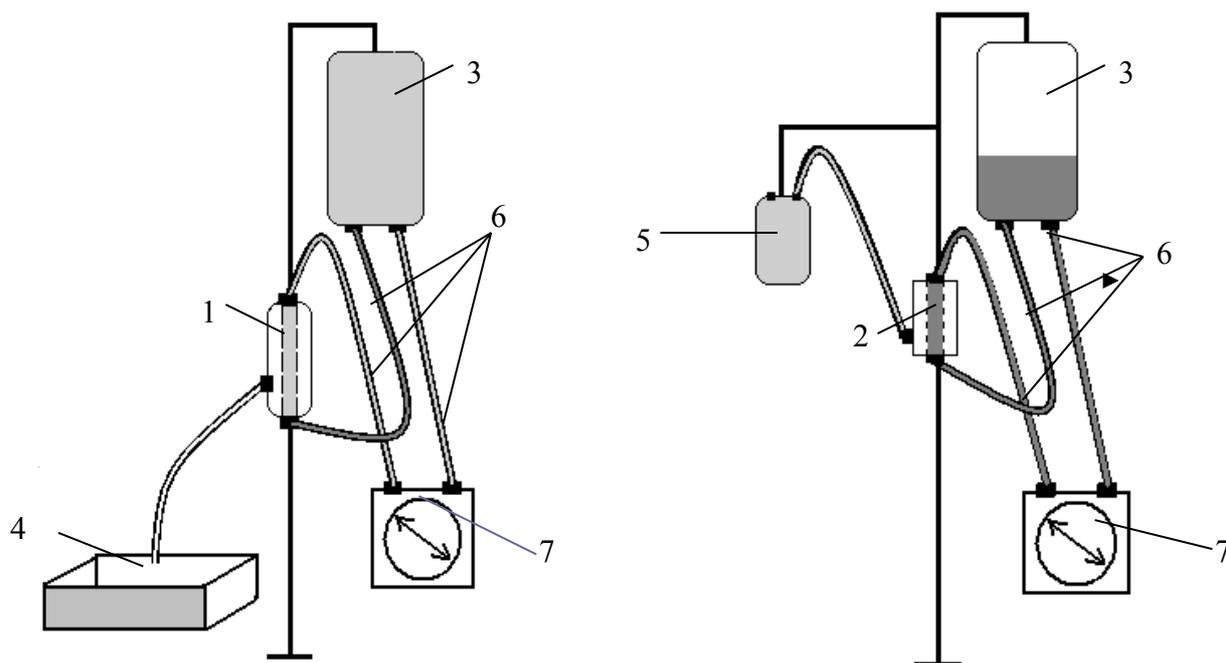


Рис. 1. Схема устройства для концентрации и фильтрации асцитической жидкости.

Работа устройства заключается в следующем: исследуемая асцитическая жидкость по отводящей магистрали при помощи роликового насоса (7) поступает в гемодиализный фильтр (1), где при помощи ультрафильтрации происходит ее концентрирование. Образующийся концентрат по магистрали возвращается обратно в контейнер (3). Водный фильтрат с цитостатиком отводится в контейнер сброса (4). Объем асцитической жидкости восстанавливается фильтратом, полученным из нативной асцитической жидкости того же больного. Для этого гемодиализный фильтр (1) в устройстве заменяется плазмофильтром ПФМ-800 (2). Из контейнера (3) нативная асцитическая жидкость того же больного по отводящей магистрали при помощи роликового насоса (7) поступает в плазмофильтр (2), где осуществляется фильтрация асцитической жидкости от клеток крови и атипичных клеток. Отфильтрованная асцитическая жидкость направляется по магистрали в контейнер (5), а концентрат, содержащий клетки, направляется обратно в контейнер с асцитической жидкостью (3).

С целью оценки пролиферативной активности и состояния апоптоза опухолевых клеток выполняли иммуноцитохимическое исследование асцитической жидкости. Данное исследование выполняли двукратно: 1) непосредственно после эксперимента; 2) через 1 сутки после химиогипертермического воздействия.

Во всех порциях эксперимента асцитическая жидкость центрифугировалась с образованием осадка, который в дальнейшем обрабатывался на цитоцентрифуге Cytospin-4. Полученные мазки окрашивались гематоксилином и эозином, по Романовскому-Гимзе, по Паппаниколу. Оценивалась цитологическая картина, клеточная концентрация в жидкости, после чего выбиралось нужное количество осадка для образования одного цитологического препарата при помощи Cytospin-4. Из каждой порции эксперимента формировалось 2 препарата для иммуноцитохимии. Цито-препараты в виде центрифугата диаметром 7 – 8 мм высушивались на воздухе, фиксировались в холодном ацетоне в течение 10 минут. После чего смачивались в трис-буфере с твином (BioOptica), обводились парафиновым карандашом. Первым этапом проводили подавление эндогенной пероксидазы при помощи 3% перекиси водорода в течение 5 минут. Все последующие этапы исследования осуществлялись во влажной бане при температуре 28°C.

Для исследования Ki-67 и каспазы 3а использовалось исследование с двойным окрашиванием: использовалась система визуализации MultiVision Polymer Detection System/ Anti-Mouse-HRP+Anti-Rabbit-AP. Первым этапом (после обработки перекисью) наносился «коктейль» из антител: Ver-EP4 (мышинное) и Ki-67 (кроличье) и Ver-EP4 (мышинное) и каспаза 3а (кроличье). После промывания в трис-буфере наносилась система визуализации MultiVision Polymer Detection System/ Anti-Mouse-HRP+Anti-Rabbit-AP. После последовательного использования хромогенов (диаминобензидин и быстрый красный), мы получали коричневое цитоплазматическое окрашивание в клетках аденокарциномы, окрашивание же на Ki-67 и каспазу 3а выявлялось красным цветом. Таким образом, осуществлялся подсчет пролиферирующих раковых клеток и клеток в состоянии апоптоза. Контр – окрашивание осуществлялось гематоксилином Майера.

Таким образом, использованный иммуноцитохимический метод исследования дает возможность обнаружить цитотоксический эффект химиогипертермического воздействия на свободные опухолевые клетки, содержащиеся в асцитической жидкости. Его применение позволило оценить и сравнить выраженность этого эффекта в зависимости от выбранного температурно-временного режима воздействия.

Результаты и их обсуждение.

При анализе современной отечественной и зарубежной литературы установлено, что в настоящее время практически отсутствуют данные, посвященные обоснованию эффективности различных температурно-временных режимов ВХГП при колоректальном раке. В

большинстве своем это экспериментальные исследования *in vitro*, где в качестве модели используются различные культуры опухолевых клеток на питательных средах.

Нами в качестве экспериментальной модели использовалась асцитическая жидкость больных колоректальным раком, в которой присутствовали свободные опухолевые клетки.

Определение жизнеспособности опухолевых клеток в «депонированной» асцитической жидкости больных проводили путем окрашивания препаратов трипановым синим. Данный краситель не окрашивает живые клетки с неповрежденной мембраной. При исследовании отобранной асцитической жидкости в 70% случаев раковые клетки были абсолютно бесцветными, что подтверждало их жизнеспособность. Способность опухолевых клеток, депонированных в асците, к инвазии и дальнейшему росту оценивали по уровню их пролиферативной активности с помощью иммуноцитохимического исследования асцитической жидкости.

Отличие раковых клеток от реактивно-измененного мезотелия проводилось с помощью иммунологических маркеров *Her-EP4* и калретинина. Позитивная реакция на *Her-EP4* проявлялась коричневым окрашиванием клеток (помечено стрелкой), что указывало на наличие в асцитической жидкости раковых клеток. Негативная реакция на *Her-EP4* при позитивной реакции на калретинин указывала на отсутствие опухолевых клеток. Проллиферативную активность опухолевых клеток асцитической жидкости оценивали через определение в клетках антител к белку *Ki-67*, который экспрессируется с G1 по M фазу клеточного цикла. При исследовании нативной асцитической жидкости в опухолевых клетках было выявлено выраженное окрашивание ядер, что указывало на их жизнеспособность и сохранность пролиферативной активности.

В настоящее время общепринятыми режимами адьювантной ВХГП являются: температура от 42 до 45°C и время экспозиции от 60 до 90 минут. Данные параметры разрабатывались с учётом воздействия на опухолевые узлы до 2 – 5 мм в диаметре. Поскольку в нашем случае предметом воздействия адьювантной ВХГП будут свободные опухолевые клетки, мы предположили, что можно сократить время перфузии, так как в данном случае не надо учитывать особенности термодинамики нормальных и опухолевых тканей.

С целью изучения действия различных температурно-временных режимов химиогипертермической перфузии на свободные опухолевые клетки химиогипертермическому воздействию подвергали асцитическую жидкость 15 больных раком толстой кишки с карциноматозом брюшины. Предварительно наличие опухолевых клеток было подтверждено с помощью иммуноцитохимического исследования.

Было выполнено исследование нативной асцитической жидкости и асцитической жидкости после химиогипертермического воздействия в 4 режимах: в двух температурных (43°C и 45°C) и двух экспозиционных (30 и 45 минут) с добавлением цисплатина из расчета 0,045 мг/мл. После удаления цитостатика асцитическую жидкость помещали в термостат при температуре 37°C. Исследование пролиферативной активности и состояния апоптоза опухолевых клеток проводили дважды: непосредственно после эксперимента и через 1 сутки после химиогипертермического воздействия. Нативную асцитическую жидкость исследовали таким же способом.

В нативной асцитической жидкости непосредственно после ее забора медиана пролиферирующих клеток составила 0,74, уровень апоптоза составил 0,05. Сразу после химиогипертермического воздействия во всех порциях асцитической жидкости происходило снижение доли пролиферирующих клеток и повышение апоптотической активности. Наименьшее число пролиферирующих клеток, а так же наибольшая активность апоптоза наблюдалась при нагреве асцитической жидкости до 43°C и 45°C при продолжительности химиогипертермического воздействия в течение 45 минут.

Через 1 сутки после забора нативной асцитической жидкости снижение уровня пролиферативной активности опухолевых клеток было незначительно, их медиана составила 0,57. Медиана апоптотической активности составляла 0,08. Наибольшее снижение уровня пролиферирующих опухолевых клеток было выявлено после химиогипертермического воздействия при температуре 43°C и 45°C при экспозиции в течение 45 минут (Me = 0,08 и 0,09 соответственно). Наибольшая апоптотическая активность так же соответствовала данным температурно-временным режимам (Me = 0,86 и 0,83 соответственно). Полученные значения медианы пролиферирующих опухолевых клеток и медианы апоптотической активности статистически значимо отличались от показателей в нативной асцитической жидкости и после химиогипертермического воздействия в других температурно-временных режимах ($p \leq 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1

Оценка пролиферативной активности (Ki-67) и состояния апоптоза (Каспаза 3a) в различных порциях асцитической жидкости

Температура жидкости (°C)	Время экспозиции (мин)	Пролиферативная активность Ki-67 (Me)		Состояние апоптоза Каспаза 3a (Me)	
		1-й день	2-й день	1-й день	2-й день

43	30	0,45	0,34	0,47	0,54
43	45	0,23	0,09	0,79	0,86
45	30	0,42	0,25	0,61	0,67
45	45	0,21	0,08	0,74	0,83
Нативная жидкость		0,74	0,57	0,05	0,08

В результате исследования было установлено, что в нативной асцитической жидкости пролиферативная активность опухолевых клеток сохранялась высокой на протяжении всего периода наблюдения, апоптотическая активность при этом была минимальной. Так, на 2 день исследования медиана пролиферативной активности опухолевых клеток составила 0,57, а медиана апоптотической активности – 0,08, что указывает на сохранение достаточно высокого уровня жизнеспособности свободных опухолевых клеток в нативной асцитической жидкости. Полученный результат подтверждает, что асцитическая жидкость является естественной средой обитания для опухолевых клеток и может быть использована в качестве биологической модели при исследовании их устойчивости к различным воздействиям.

По результатам экспериментального исследования наиболее эффективными температурно-временными режимами оказались: температура перфузата 43°C и 45°C при экспозиции 45 минут. Различия результатов химиогипертермического воздействия в данных температурно-временных режимах были статистически не значимы ($p > 0,05$). Однако, температурный режим 43°C является более мягким по отношению к 45°C и, соответственно, прогностически более благоприятным в отношении анестезиологического пособия и послеоперационных осложнений, что является особенно актуальным в условиях ургентной хирургии.

Таким образом, наиболее эффективным температурно-временным режимом для выполнения адьювантной внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии при выполнении оперативных вмешательств по поводу осложненного рака толстой кишки является – температура перфузата 43°C, время перфузии – 45 минут.

Заключение.

Выполнение адьювантной интраоперационной внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии в стандартных режимах существенно увеличивает продолжительность операции, что осложняет анестезиологическое пособие и может привести к ряду послеопе-

рационных осложнений. Данное обстоятельство имеет особенно важное значение, так как оперативное лечение проводится в условиях экстренной операционной и предъявляет повышенные требования к состоянию пациентов на момент операции. Так как адьювантная ИО ВХГП направлена против свободных опухолевых клеток и микроскопических очагов карциноматоза брюшины, уменьшение агрессивности методики теоретически возможно за счет смягчения ее температурно-временного режима.

С целью разработки «мягкого», но эффективного режима адьювантной интраоперационной внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии необходимо определить показания для ее проведения, разработать специальный температурно-временной режим.

В экспериментальной части исследования в качестве биологической модели мы использовали асцитическую жидкость больных раком толстой кишки при условии наличия в ней свободных опухолевых клеток. В предлагаемой модели осуществляли химиогипертермическое воздействие на опухолевые клетки в естественной для них среде. С помощью высокоинформативного иммуноцитохимического метода оценили уровень пролиферативной активности и активности апоптоза опухолевых клеток в нативной асцитической жидкости и в жидкости после химиогипертермического воздействия на 1 и 2 день эксперимента. Оптимальным режимом выполнения адьювантной интраоперационной внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии оказалась экспозиция 45 минут при температуре перфузата 43°C. Медиана (Me) пролиферативной активности на 2 день эксперимента, составила 0,09; медиана апоптотической активности – 0,86.

Выводы.

1. Иммуноцитохимический метод исследования асцитической жидкости больных колоректальным раком при наличии в ней свободных опухолевых клеток позволяет создать биологическую модель для изучения различных температурных и временных режимов ВХГП.

2. Экспериментально обоснованным оптимально эффективным режимом адьювантной интраоперационной внутрибрюшинной химиогипертермической перфузии является: температура перфузата 43°C и времени перфузии 45 минут, при дозировке цисплатина 150 мг/м². Данный режим адьювантного интраоперационного лечения больных с осложненным раком толстой кишки достаточно эффективно снижает пролиферативную активность опухолевых клеток (медиана пролиферирующих клеток снижалась до 0,09), при этом апоптотическая активность существенно возрастает (медиана активности апо-

птоза – 0,86). Использование данного режима не увеличивает число интра- и послеоперационных осложнений.

Литература.

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2007 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2009. – Т. 20, № 3. – С. 52–90.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Смертность населения России и стран СНГ от злокачественных новообразований в 2007 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2009. – Т. 20, № 3. – С. 99 – 122.
3. Сотниченко Б.А., Дмитриев М.О. Осложненный колоректальный рак: не только хирургическая, но и социальная проблема // Pacific Medical Journal. – 2004. – № 4. – P. 39–42.
4. Брискин Б.С., Дибиров М.Д., Малышев Е.А. Возможные пути улучшения непосредственных и отдаленных результатов хирургического лечения обтурационной опухолевой толстокишечной непроходимости // Материалы Пленума Проблемной комиссии «Неотложная хирургия» Межведомственного научного совета по хирургии РАМН и Рос. науч.-практ. конф. – М.; Курск, 2007. – С. 24–25.
5. Петров В.П., Лазарев Г.В., Китаев А.В. и др. Современные подходы к хирургическому лечению колоректального рака // Проблемы колопроктологии. – 2002. – № 18. – С. 285–288.
6. Гайнутдинов Ф.М., Куляпин А.В., Ахметов И.Х. и др. Лечение осложненных форм колоректального рака // Междунар. хирург. конгр. «Актуальные проблемы современной хирургии». – М., 2003. – 199 с.
7. Гринев М.В., Беляев А.М., Карачун Р.В. Алгоритм лечения осложненных и запущенных форм колоректального рака: Пособие для врачей. – СПб., 2002. – 12 с.
8. Koppe M.J., Boerman O.C., Wim J.G. et al. Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Origin. Incidence and Current Treatment Strategies // Ann. Surg. – 2006. – Vol. 243, № 2. – P. 212–222.
9. Ripley R.T., Davis J.L., Kemp C.D. Prospective randomized trial evaluating mandatory second look surgery with HIPEC and CRS vs. standard of care in patients at high risk of developing colorectal peritoneal metastases // [Trials Journal. – 2010. – Vol. 11, № 62. – P. 1–8.](#)

10. Fujii S., Shimada H., Yamagishi S. et al. Evaluation of intraperitoneal lavage cytology before colorectal cancer resection // *Int. J. Colorectal Dis.* – 2009. – Vol. 24, № 8. – P. 907–914.
11. De Roover A., Detroz B., Detry O. et al. Prognostic analysis of clinicopathologic factors in 49 patients with diffuse malignant peritoneal mesothelioma treated with cytoreductive surgery and intraperitoneal hyperthermic perfusion // *Ann. Surg. Oncol.* – 2006. – Vol. 13, № 2. – P. 229–237.
12. Scaringi S., Kianmanesh R., Sabate J.M. et al. Advanced gastric cancer with or without peritoneal carcinomatosis treated with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: a single western center experience // *Eur. J. Surg. Oncol.* – 2008. – Vol. 34, № 11. – P. 1246–1252.
13. Dewhirst M.W., Vujaskovic Z., Jones E. et al. Resetting the biologic rationale for thermal therapy // *Int. J. Hyperthermia.* – 2005. – Vol. 21, № 8. – P. 779–790.
14. Lepock J.R. Measurement of protein stability and protein denaturation in cells using differential scanning calorimetry // *Methods.* – 2005. – Vol. 35, № 2. – P. 117–125.
15. Кошелев Т.Е. Адьювантная интраоперационная внутрибрюшинная химиогипертермическая перфузия при раке желудка: экспериментальное и клиническое исследование: Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Санкт-Петербург., - 2010. – 24 с.