

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА — ПРАКТИЧЕСКОМУ ЗДРАВООХРАНЕНИЮ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.832.8.015.2:615.277.3].015.44

Анисимова Н.Ю., Киселевский М.В., Абдуллаев А.Г., Малахова Н.В., Ситдикова С.М., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.М.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия

Введение. Результаты системной химиотерапии при канцероматозе брюшины неудовлетворительны в связи с плохим проникновением противоопухолевых препаратов в серозные полости из-за наличия перитонеально-плазматического барьера. Одним из возможных способов усиления действия цитостатиков является использование химиотерапии и гипертермии, которая, по некоторым данным, обладает самостоятельным цитотоксическим эффектом.

Задачи исследования: изучение влияния различных режимов гипертермии на физиологическую активность перевиваемых линий опухолевых и нетрансформированных клеток.

Результаты. Анализ воздействия гипертермии на физиологическую активность перевиваемых линий опухолевых и нетрансформированных клеток *in vitro* и *in vivo* продемонстрировал, что с увеличением уровня и времени температурного воздействия повышается степень повреждения и гибель опухолевых клеток. В данном исследовании наиболее эффективным был следующий режим: температура выше 45°C с экспозицией более двух часов, что на практике трудно осуществимо в связи с ограниченной толерантностью здоровых тканей.

Заключение. При использовании гипертермии в монорежиме не представляется возможным достичь эффективных воздействующих температурных уровней, которые могли бы оказать значимое ингибирующее влияние на опухолевые клетки.

Ключевые слова: канцероматоз брюшины; гипертермия; интраперитонеальная химиоперфузия.

Для цитирования: Анисимова Н.Ю., Киселевский М.В., Абдуллаев А.Г., Малахова Н.В., Ситдикова С.М., Полоцкий Б.Е., Давыдов М.М. Влияние гипертермии на жизнеспособность и пролиферативную активность опухолевых клеток. *Российский онкологический журнал*. 2016; 21 (5): 250–252. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2016-21-5-250-252>

Для корреспонденции: Абдуллаев Амир Гусейнович, канд. мед. наук, старший научный сотрудник то-ракального отделения НИИ клинической онкологии; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, E-mail: amirdo@mail.ru.

Anisimova N. Yu., Kiselevskiy M. V., Abdullaev A. G., Malakhova N. V., Sitdikova S. M., Polotskiy B. E., Davydov M. M. EFFECT OF HYPERTHERMIA ON THE VIABILITY AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF TUMOR CELLS
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, 115478, Russian Federation

Introduction. Results of the systemic chemotherapy in the peritoneum canceromatosis are unsatisfactory because of poor penetration of anticancer drugs in serous cavities due to the presence of peritoneal-plasma barrier. One of the possible ways to enhance the action cytostatic agents is the use of chemotherapy and hyperthermia, which, according to some data, has an own cytotoxic effect.

The purpose of the study. The study of the effect of different modes of hyperthermia on the physiological activity of transplantable lines of tumor and non-transformed cells.

Results. Analysis of the impact of hyperthermia on the physiological activity of transplantable lines of tumor and the non-transformed cells *in vitro* and *in vivo* studies demonstrated that along with the gain in the level and time of the temperature exposure as the degree of damage as tumor cell mortality rate increases. In this study the most effective treatment was as follows: the temperature is above 45°C with the exposure of more than 2 hours, which is difficult to achieve in practice due to the limited tolerance of healthy tissues.

Conclusion. With the use of hyperthermia in monoregimen it is not possible to achieve effective levels of the temperature impact, which could hardly have a significant inhibitory effect on tumor cells.

Key words: peritoneal carcinomatosis; hyperthermia; intraperitoneal chemoperfusion.

For citation: Anisimova N. Yu., Kiselevskiy M. V., Abdullaev A. G., Malakhova N. V., Sitdikova S. M., Polotskiy B. E., Davydov M. M. Effect of hyperthermia on the viability and proliferative activity of tumor cells. *Rossiiskii onkologicheskii zhurnal. (Russian Journal of Oncology)*. 2016; 21 (5): 250–252. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/1028-9984-2016-21-5-250-252>

For correspondence: Amir G. Abdullaev, MD, PhD, Senior researcher of the Thoracic Department of the Research Institute of Clinical Oncology; Moscow, 115478, Russian Federation, E-mail: amirdo@mail.ru.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. The study had no sponsorship.

Received 11 May 2016
Accepted 26 May 2016

Канцероматоз брюшины развивается на фоне прогрессирования целого ряда опухолей брюшной локализации. Эффективность системного лечения этой категории пациентов лимитирована плохим проникновением противоопухолевых средств в серозные полости. За прошлые два десятилетия появились новые

подходы к лечению перитонеального канцероматоза, объединенные общим названием «циторедуктивные операции в сочетании с интраперитонеальной химиотерапией с гипертермией». Многие авторы рассматривают данное лечение как стандартное при псевдомиксоме брюшины, мезотелиоме, интраперитонеаль-

Таблица 1

Изменение относительно контроля параметров клеточной культуры после ее инкубации при высокой температуре

Культура клеток	Режим температурного воздействия, °C								
	41	42	43	44	45	46	47	48	50
Изменение концентрации физиологически активных клеток в культуре, %									
К-562	-2 ± 8	-2 ± 10	-4 ± 5	-25 ± 10	-27 ± 7*	-34 ± 2*	-48 ± 11*	-66 ± 7*	-74 ± 14*
MCF-7	-3 ± 11	-4 ± 10	-3 ± 10	-28 ± 4	-34 ± 3*	-42 ± 5*	-56 ± 14*	-63 ± 5*	-65 ± 20*
SCOV3	0 ± 16	-7 ± 11	-10 ± 9	-23 ± 7	-30 ± 9	-38 ± 5*	-50 ± 5*	-66 ± 16*	-83 ± 19*
VERO	0 ± 4	-5 ± 7	-4 ± 13	-18 ± 22	-25 ± 8	-32 ± 10	-57 ± 14*	-61 ± 14*	-74 ± 24*
КСТ	-12 ± 15	-16 ± 13	-24 ± 13	-25 ± 4	-28 ± 11	-48 ± 19	-57 ± 21*	-71 ± 14*	-84 ± 24*
ЛЭК	-5 ± 22	-8 ± 11	-10 ± 15	-20 ± 5	-22 ± 10	-25 ± 16	-30 ± 12	-38 ± 8*	-69 ± 16*
Изменение пролиферативной активности исследованных клеточных культур, %									
К-562	-3 ± 23	-4 ± 10	-11 ± 14	-39 ± 10*	-42 ± 15*	-51 ± 11*	-68 ± 20*	-92 ± 8*	-98 ± 2*
MCF-7	-2 ± 7	-3 ± 5	-20 ± 11	-42 ± 7*	-45 ± 5*	-79 ± 10*	-90 ± 10*	-98 ± 5*	-100 ± 1*
SCOV3	-15 ± 15	-23 ± 12	-27 ± 2*	-34 ± 7*	-50 ± 8*	-56 ± 16*	-75 ± 10*	-79 ± 11*	-83 ± 17*
VERO	-16 ± 12	-14 ± 4	-18 ± 5	-25 ± 5	-31 ± 10	-38 ± 10*	-42 ± 5*	-64 ± 13*	-77 ± 18*
КСТ	-22 ± 18	-24 ± 2	-24 ± 4	-38 ± 22	-49 ± 11*	-63 ± 4*	-65 ± 11*	-74 ± 12*	-73
ЛЭК	-3 ± 2	-24 ± 5	-28 ± 9	-30 ± 9	-44 ± 10*	-42 ± 1*	-46 ± 8*	-64 ± 7*	-89

Примечание: * – достоверное ($p \leq 0,1$) отличие от контроля.

но диссеминированном раке яичников, однако вопрос относительно эффективности данного подхода все еще остается спорным [1–3].

Идея гипертермического воздействия основана на следующих постулатах: 1) создание высокой концентрации цитостатиков в области опухолевого процесса; 2) уменьшение системной токсичности; 3) модификация действия цитостатиков при сочетании использования гипертермии [4].

Средние значения температуры раствора для перфузии брюшной полости, используемые различными авторами, колеблются в пределах 40–45°C [5–7]. Поэтому остается нерешенным один из основных вопросов при использовании внутрибрюшинной гипертермии – определение оптимального температурного режима, который бы обладал наибольшей опухолевой цитотоксичностью, при минимально возможном числе осложнений. Поэтому целью настоящей работы было изучение влияния различных режимов гипертермии на физиологическую активность перевиваемых линий опухолевых и нетрансформированных клеток при имплантации мышам.

Материал и методы

Перевиваемые линии опухолевых клеток: К-562 (эритромиелоидный лейкоз человека), MCF-7 (рак молочной железы человека), SCOV3 (рак яичников человека); нетрансформированных клеток VERO (клетки почки зеленой африканской мартишки), КСТ (клетки эндотелия сосудов телят) и ЛЭК (клетки легкого эмбриона коровы) и клетки опухоли Эрлиха (рак молочной железы мышей) были получены из банка клеточных линий ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клетки культивировали в полной культуральной среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки, глутамина и пенициллин-стрептомицина.

Тестируемые клетки (1 млн) помещали в стерильные пробирки на 2 ч на водяную баню при температурах 41–50°C. В контрольной серии клетки инкубировали в тех же условиях при температуре 37°C.

Затем суспензию клеток рассеивали в 96-луночные микропланшеты и инкубировали в течение 1 сут в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Процентное содержание физиологически активных клеток в культуре определяли с помощью МТТ-колориметрического теста через 24 и 48 ч. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 540 нм на спектрофотометре Multiskan-(Labsystems).

Для испытания на мышах линии C57Bl суспензию клеток опухоли Эрлиха в питательной среде RPMI-1640 прогревали в течение 2 ч при температуре 41–50°C (в контрольной серии – при 37°C). Подсчитывали количество живых клеток с использованием трипанового синего. Затем их концентрировали центрифугированием. Мышам клетки вводили подкожно по 500 000 кл/мышь или внутрибрюшинно по 1 500 000 кл/мышь. Животным контрольных групп вводили физиологический раствор хлорида натрия. Результат учитывали по изменению объема видимой опухоли и массы тела подопытных животных.

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента, критерия Вилкоксона при помощи стандартного пакета статистических программ Windows 2003 (StatSoft 6.0).

Результаты и обсуждение

Проведенные в опытах *in vitro* исследования позволили установить, что достоверное, относительно контроля, уменьшение физиологически активных клеток в культуре опухолевых клеток наблюдали только после прогревания в течение 2 ч при температуре не ниже 44°C. При этом минимальный значимый эффект для линий клеток К-562 ($\leq -29\%$), MCF-7 ($\leq -34\%$) отмечали при воздействии температуры 44°C, а для линии клеток SCOV3 – при 46°C ($\leq -38\%$). Аналогичный эффект для нетрансформированных клеток зарегистрирован при температуре, равной или превышающей 45°C для линий VERO ($\leq -57\%$) и КСТ ($\leq -57\%$) и 48°C для линии клеток ЛЭК ($\leq -38\%$) (табл. 1).

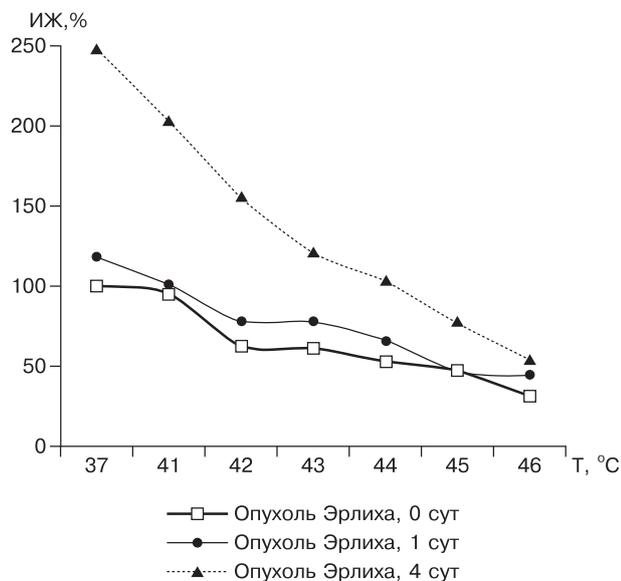


Рис. 1. Индекс жизнеспособности (ИЖ) и пролиферативная активность клеток опухоли Эрлиха при гипертермии относительно контроля при 37°C (0 сут).

Статистически достоверное угнетение пролиферативной активности клеток ($p \leq 0,01$) через 2 сут после гипертермического воздействия отмечено в образцах, подвергавшихся действию режимов 44°C (опухолевые клетки) и 45°C (нетрансформированные эмбриональные клетки).

Достоверное снижение жизнеспособности клеток опухоли Эрлиха отмечали при нагревании до 43°C. При 45°C регистрировалась гибель около 50% клеток. При этом пролиферативный потенциал клеток, подвергнутых гипертермии, сохранялся вплоть до 46°C (рис. 1).

При исследовании динамики роста опухоли у мышей установлено, что у животных с привитыми клетками опухоли Эрлиха, подвергнутыми предварительному температурному воздействию при 42 и 43°C, отмечалась тенденция к уменьшению объема опухолевых узлов по сравнению с животными контрольной группы. Отсутствие опухолевого роста зарегистрировано только при имплантации мышам опухолевых клеток при температуре 44°C. Прогревание опухолевых клеток при температуре 41°C не влияло на рост опухолевого узла (рис. 2).

Заключение

Анализ воздействия гипертермии на физиологическую активность перевиваемых линий опухолевых и нетрансформированных клеток *in vitro* и *in vivo* продемонстрировал, что с увеличением уровня и времени температурного воздействия повышается степень повреждения и возникает гибель опухолевых клеток. В данном исследовании наиболее эффективным был следующий режим: температура выше 45°C с экспозицией более 2 ч, что на практике трудно осуществимо в связи с ограниченной толерантностью здоровых тканей. Таким образом, высокотемпературное воздействие достоверно подавляет способность опухолевых клеток к пролиферации только при температуре не менее 44°C. Температурные режимы, рекомендованные для клинической

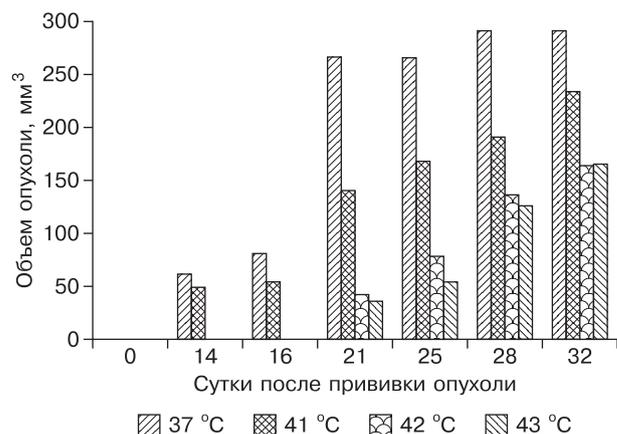


Рис. 2. Динамика роста опухоли Эрлиха после предварительного прогревания при подкожном введении (медианные значения).

практики (41–43°C), не оказывают существенного влияния на жизнеспособность опухолевых клеток. В опытах на мышах с привитой опухолью Эрлиха установлено, что отсутствие опухолевого роста наблюдалось только при предварительном прогревании клеток при температуре 44°C.

Таким образом, при использовании гипертермии в монорежиме не представляется возможным достичь эффективных воздействующих температурных уровней, которые могли бы оказать значимое ингибирующее влияние на опухолевые клетки. Поэтому необходимо исследовать сочетанные режимы гипертермии с химиопрепаратами и иммуномодуляторами, стимулирующими врожденное звено противоопухолевого иммунитета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wang H., Wang X., Ju Y., Wang J., Zhang X., Cheng Y. et al. Clinicopathological features and prognosis of pseudomyxoma peritonei. *Exp. Ther. Med.* 2014; 7 (1): 185–90.
2. Chua T.C., Moran B.J., Sugarbaker P.H., Levine E.A., Glehen O., Gilly F.N. et al. Early- and long-term outcome data of patients with pseudomyxoma peritonei from appendiceal origin treated by a strategy of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30: 2449–56.
3. Robella M., Vaira M., Mellano A., Marsanic P., Cinquegrana A., Borsano A. et al. Treatment of diffuse malignant peritoneal mesothelioma (DMPM) by cytoreductive surgery and HIPEC. *Ann. Surg. Oncol.* 2014; 21 (4): 1159–65.
4. Oleson J.R., Calderwood S.K., Coughlin C.T. et al. Biological and clinical aspects of hyperthermia in cancer therapy. *Am. J. Clin. Oncol.* 1988; 11: 368–80.
5. Elias D., Raynard B., Boige V., Laplanche A., Estphan G., Malka D., Pocard M. Impact of the extent and duration of cytoreductive surgery on postoperative hematological toxicity after intraperitoneal chemohyperthermia for peritoneal carcinomatosis. *J. Surg. Oncol.* 2005; 90: 220–5.
6. Glehen O., Cotte E., Brigand C., Arvieux C., Sayag-Beaujard A.C., Gilly F.N. Therapeutic innovations in the management of peritoneal carcinomatosis from digestive origin: Cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy. *Rev. Med. Int.* 2006; 27: 382–91.
7. Smeenk R.M., Verwaal V.J., Zoetmulder F.A. Toxicity and mortality of cytoreduction and intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in pseudomyxoma peritonei—a report of 103 procedures. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2006; 32: 186–90.

Поступила 11.05.16
 Принята к печати 26.05.16