

О.Ф. Лигирда  
К.О. Галахін  
І.І. Смолянка  
Ю.Й. Кудрявець  
Н.А. Безденежних  
Е.Р. Денека  
Н.Ф. Лигирда  
В.В. Сорочіна

Інститут онкології  
АМН України

Інститут експериментальної  
патології, онкології та  
радіобіології ім. Р.Є. Кавецького,  
Київ, Україна

## МОДИФІКОВАНА ХІМІОТЕРАПІЯ ХВОРИХ НА МІСЦЕВО- ПОШИРЕНИЙ РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

**Резюме.** Наведені результати лікування хворих на місцево-поширений рак молочної залози (РМЗ) із застосуванням неоад'ювантної системно-селективної поліхіміотерапії у поєднанні з хіміомодифікатором (глюконатом кальцію). Отримані дані експериментальних досліджень з використанням культур клітин РМЗ *in vitro* та безпосередні результати лікування довели доцільність та безпечність застосування глюконату кальцію як важливого компонента розробленої авторами схеми терапії.

**Ключові слова:** рак молочної залози, внутрішньоартеріальна хіміотерапія, неоад'ювантна поліхіміотерапія, глюконат кальцію.

Лікування хворих на місцево-поширені форми раку молочної залози (РМЗ) залишається актуальною проблемою у сучасній клінічній онкології, оскільки захворюваність на РМЗ в Україні в 2005 р. становила 60,3 випадків на 100 тис. жіночого населення, летальність — 30,1 випадків відповідно [1].

Незважаючи на високий рівень ранньої діагностики початкових стадій захворювання на РМЗ (73,1%), у нашій країні у 2005 р. виявлено до 24,5% випадків РМЗ III–IV стадії, що призводить до підвищення затрат на комплексне лікування в 25–30 разів порівняно з ранніми стадіями [2], а також до погіршення показників віддалених результатів (безрецидивна, 3- та 5-річна виживаність). За даними Національного інституту раку США показники 5-річної виживаності залежно від ступеня розповсюдженості пухлинного процесу становлять: 0 стадія — 99, I стадія — 92, IIА стадія — 82, IIВ стадія — 65, IIIА стадія — 47, IIIВ стадія — 44, IV стадія — 14% [3].

Сучасною методологією лікування хворих репродуктивного віку на місцево-поширений РМЗ є комбінований підхід, при якому на першому етапі з метою зменшення ступеня розповсюдженості пухлинного процесу проводиться декілька курсів неоад'ювантної хіміотерапії (НХТ) із наступним хірургічним лікуванням та післяопераційною (ад'ювантною) терапією [4–7]. Відомо, що НХТ спрямована на переведення первинно-неоперабельних форм РМЗ у резектабельні шляхом зменшення розміру пухлини та гальмування метастатичного росту, елімінацію ракових клітин [8–12]. Застосування НХТ дозволяє визначати чутливість пухлини до хіміотерапевтичних препаратів (ХП) для подальшого призначення ад'ювантного лікування. НХТ, як правило, виконується системно — внут-

рішньовенно (в/в), найчастіше за схемами САМФ, САФ, АС. Об'єктивна відповідь при даних режимах хіміотерапії (ХТ) становить до 85,0% при загальній патоморфологічній відповіді — 87,8%. При проведенні ХТ найчастіше виникають такі побічні явища як диспепсія (нудота, блювота) та імуносупресія 3–4-го ступеня токсичності, яку відзначають у 36,0% пацієнтів [12]. Усе це погіршує якість життя хворих, потребує вимушеної перерви у лікувальному процесі, що знижує його ефективність.

Для запобігання вищевказаних негативних наслідків в/в ХТ та підвищення ефективності протипухлинної дії використовується внутрішньоартеріальна поліхіміотерапія (ВАПХТ) [13–28]. Найбільш оптимальним методом ВАПХТ при лікуванні місцево-поширених форм РМЗ є катетеризація внутрішньої грудної артерії. Основна частина кровопостачання молочної залози здійснюється за рахунок гілок внутрішньої грудної артерії (до 60%), та решта — латеральною та верхньою грудними артеріями. Спосіб ВАПХТ через внутрішню грудну артерію дозволяє локально підводити ХП безпосередньо до пухлини, що гальмує її проліферативну активність, мінімізує токсичний вплив НХТ. Методику ВАПХТ проводять у середньому до 3 курсів у режимі тривалої безперервної інфузії ХП у запланованому обсязі перед хірургічним лікуванням. Недоліком цього способу є обмежена можливість вибору ХП для внутрішньоартеріального (в/а) введення. Застосування інтенсивних режимів НХТ (антрациклінів, препаратів платини, таксанів) може призводити до стеатонекрозів шкіри та підшкірної жирової клітковини молочної залози, хімічних опіків ендотелію судин, що катетеризуються, ускладнюючи тим самим виконання радикальної мастектомії.

Відомо, що для підвищення ефективності лікування поряд з НХТ застосовують імунотерапію, гіпертермію та гіперглікемію, внутрішньосудинне лазерне опромінення крові [3, 13, 29]. Однак сукупні результати оцінки лікувального патоморфозу РМЗ за даними власного досвіду свідчать не тільки про переваги, а й про недоліки цих методів. Так, вищевказані ад'юванти достовірно, хоча і опосередковано, підвищують девіталізуючу дію ХТ на пухлину, однак безпосередньо не впливають на внутрішньоклітинний метаболізм ракових клітин, не пошкоджують їх ядерний апарат, не зумовлюють некроз.

У зв'язку з цим підвищений інтерес викликають відомості про роль іонних каналів у процесах клітинної проліферації та індукованого апоптозу [30]. На сьогодні активно вивчають вплив іонів кальцію ( $Ca^{2+}$ ) як модифікатора антибластомного впливу та індуктора апоптозу при карциномах молочної залози та передміхурової залози [31–33]. Саме цей метаболіт є потенційним профілактичним агентом у запобіганні розвитку РМЗ [31, 34]. В експериментах *in vivo* з використанням перевивних пухлин молочної залози, а також на ракових клітинах молочної залози людини *in vitro* показано, що в умовах кальцієвого перевантаження (домінування внутрішньоклітинного  $Ca^{2+}$  над позаклітинним) гальмується клітинний цикл у фазі G1, лімітується або зупиняється клітинне розмноження, розвиваються цитотоксичні ефекти [35].

Метою даного дослідження є підвищення ефективності протипухлинного лікування хворих на місцево-поширені форми РМЗ шляхом розробки та застосування неоад'ювантної ВАПХТ модифікованої глюконатом кальцію (ГК).

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Клінічні дослідження.** Як НХТ у хворих репродуктивного та пременопаузального віку з місцево-поширеними формами РМЗ (Т3-4N1-2M0) застосовують ВАПХТ, здійснювану шляхом катетеризації внутрішньої грудної артерії на боці пухлинного ураження молочної залози. Локалізація РМЗ: внутрішні та центральні квадранти молочної залози. Для визначення тактики лікування до початку ВАПХТ виконували тонкоголкову аспіраційну біопсію для цитологічної верифікації РМЗ. Усі пацієнтки у даному дослідженні були розподілені на 3 групи: 1-ша (контрольна) група — неоад'ювантна системна (в/в) ПХТ за схемою САМФ при локалізації пухлини у зовнішніх квадрантах — 32 хворі; 2-га група — неоад'ювантна ВАПХТ за схемою СМФ у поєднанні з в/в введенням антрациклінів (епірубіцин у дозі  $60 \text{ мг/м}^2$ ) при локалізації пухлини в центральному секторі або внутрішніх квадрантах — 29 хворих; 3-тя група — неоад'ювантна ВАПХТ за схемою СМФ у поєднанні з в/в введенням антрациклінів (епірубіцин у дозі  $60 \text{ мг/м}^2$ ) та ГК як модифікатора цитостатичної дії ХП (10% розчин у дозі 5,0 мл на введення) при локалізації пухлини у центральному секторі або

внутрішніх квадрантах, а також при наявності вторинного набряково-інфільтративного компонента — 28 хворих.

Розподіл пацієнток на місцево-поширені форми РМЗ за віком і стадією наведено відповідно в табл. 1, 2.

Таблиця 1  
Розподіл хворих на місцево-поширені форми РМЗ за віковими групами

Вік (роки)	Група хворих		
	1-ша (n = 32), n (%)	2-га (n = 29), n (%)	3-тя (n = 28), n (%)
30–39	8 (25,0 ± 7,7)	7 (24,1 ± 8,0)	7 (25,0 ± 8,2)
40–49	16 (50,0 ± 8,8)	16 (55,2 ± 9,2)	14 (50,0 ± 9,5)
50–55	8 (25,0 ± 7,7)	6 (20,7 ± 7,5)	7 (25,0 ± 8,2)

Примітка: в усіх випадках  $p > 0,05$ .

Таблиця 2  
Розподіл хворих за стадією процесу

Стадія процесу	Група хворих		
	1-ша (n = 32), n (%)	2-га (n = 29), n (%)	3-тя (n = 28), n (%)
IIIА	25 (78,1 ± 7,3)	24 (82,8 ± 7,0)	22 (78,6 ± 7,8)
IIIБ	7 (21,9 ± 7,3)	5 (17,2 ± 7,0)	6 (21,4 ± 7,8)

Примітка: в усіх випадках  $p > 0,05$ .

У 1-й групі хворим проводили 3 курси системної (в/в) НПХТ за схемою САМФ (циклофосфамід —  $500 \text{ мг/м}^2$  в/в у 1-й та 8-й день, метотрексат —  $40 \text{ мг/м}^2$  в/в у 1-й та 8-й день, флуороурацил —  $500 \text{ мг/м}^2$  в/в у 1-й та 8-й день, епірубіцин —  $60 \text{ мг/м}^2$  в/в у 1-й та 8-й день) з інтервалом між курсами 3 тиж.

У 2-й та 3-й групах хворим проводили катетеризацію внутрішньої грудної артерії на ураженому боці. Під загальним знеболенням у проекції перетину реберної дуги та медіального краю прямого м'яза живота косим розрізом паралельно реберній дузі розтинали шкіру, підшкірну жирову клітковину та поверхневий листок апоневрозу прямого м'яза живота. Волокна прямого м'яза живота відокремлювали до внутрішнього листка апоневрозу. Виконували сепаровку з мобілізацією верхньої епігастральної артерії, дистальний кінець якої перев'язували, а у проксимальній за допомогою судинорозширювача вводили катетер в основний стовбур внутрішньої грудної артерії до рівня II міжребер'я. Судину над катетером перев'язували. Рану пошарово зашивали з виведенням катетера назовні через контапертуру та фіксуванням його до шкіри вузловим швом. Катетер промивався розчином гепарину ( $5000 \text{ ОД}$  гепарину на  $10,0 \text{ мл}$  фізіологічного розчину). Топографію встановленого катетера визначали інтраопераційною ангіохроматографією шляхом введення в/а  $2 \text{ мл}$  водного розчину метиленового синього та рентгеноваскулярного контрастування («Омніпак» виробництва фірми «Nycomed»).

Наступного дня після оперативного втручання починали проведення ВАПХТ. Тривалість лікування — 11 днів, сумарна доза ХП: метотрексат —  $120 \text{ мг}$ , циклофосфамід —  $2 \text{ г}$ , флуороурацил —  $2,5 \text{ г}$  та епірубіцин  $60 \text{ мг/м}^2$ . У 3-й групі хворих безпосередньо за  $20 \text{ хв}$  до проведення ВАПХТ щодня в/а вводили по  $5,0 \text{ мл}$  10% розчину ГК з подальшим введенням ХП у стандартних терапевтичних дозах. Сеанс ВАПХТ проводили за допомогою апарата «Injectomat cp-PS». У подальшому повторні кур-

си проводили кожні 3 тиж. Після закінчення НХТ при досягненні максимальної об'єктивної відповіді на неоад'ювантне лікування проводили операцію — радикальну мастектомію з наступною ад'ювантною терапією (ПХТ, променева, гормональна терапія).

Для морфологічного дослідження операційного матеріалу РМЗ з пухлини вирізали три тканинних пластинки (по одній з периферичної, проміжної, центральної зони пухлинного вузла) з подальшим виготовленням гістологічних зрізів, що забарвлювали гематоксиліном-еозіном, пікрофуксином. Проведено кількісні підрахунки патологічних мітозів і апоптозів з розрахунку на 1 поле зору при стандартному збільшенні ( $\times 120$ ) (світловий мікроскоп «Polyvar-2», «Reichert», Австрія). Підрахунок здійснено за відомими формулами, що використовують у морфології [43] з визначенням середньоарифметичного показника дольового вмісту дослідженого компонента в пухлині РМЗ ( $M \pm m, \%$ ). При застосуванні електронної мікроскопії ультратонкі зрізи РМЗ обробляли лантаном (колоїдна форма, рН-8,1) за методикою Revel, Karnovsky. Для порівняльної морфологічної оцінки виділили 0 групу (операційний матеріал РМЗ без неоад'ювантного лікування — контроль).

**Експериментальні дослідження.** ГК вивчали *in vitro* в культурах клітин РМЗ людини (лінії MCF-7, T-47 D, культури пухлинних клітин, отриманих з плеврального ексудату хворих на РМЗ).

Клітини як постійних ліній, так і первинних культур з плеврального ексудату культивували в повному поживному середовищі DMEM («Фармбіотек», Україна), що містило 4 ммоль/л L-глутаміну, 10% (15% у випадку первинних культур) ембріональної сироватки теляти («SIGMA», США), 40 мкг/мл гентаміцину та 50 мкг/мл амфотерицину В («SIGMA», США) у зволоженій атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С. Заміну середовища проводили кожні 2 доби. Пересів клітин здійснювали за допомогою розчину трипсин-версена при утворенні клітинами на субстраті суцільного моношару (4–5-та доба росту). Суспензію клітин вносили у 96- або 24-лункові планшети у концентрації відповідно  $2\text{--}3 \times 10^4$  (у 100 мкл) або  $4\text{--}5 \times 10^4$  клітин/лунку (в 1 мл). Наступного дня у лунку вносили досліджувані (ГК, ГК + доксорубіцин) препарати та результати їх дії аналізували через 24, 48 та 72 год. Внесення свіжої порції препаратів повторювали щодоби. При використанні 24-лункових планшетів візуалізацію живих та мертвих клітин проводили за допомогою забарвлення трипановим синім з наступним підрахунком клітин у гемоцитометрі. У 96-лункових планшетах результати реєстрували через 48–72 год за допомогою SRB-тесту [36]. Для морфологічних досліджень препарати клітинних суспензій висушували та забарвлювали за Папенгеймом, аналізували за допомогою біокулярного мікроскопа Axiostar Plus («Carl Zeiss», Німеччина) при збільшенні 400–1000. Вивчення культур живих клітин (вирощували в 6-луночних планшетах Greiner, проводили за допомогою інвертовано-

го мікроскопа Axiovert 25 («Carl Zeiss», Німеччина) при збільшенні в 100–320. Препарати живих та забарвлених клітин фотографували за допомогою цифрової фотокамери Canon PowerShot G5 (Великобританія).

Статистичну обробку даних проводили за допомогою критерія Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ефективність передопераційного лікування оцінювали за безпосередніми результатами терапії (пальпаторне дослідження пухлини молочної залози, мамографія) та показниками лікувального патоморфозу РМЗ (операційний матеріал).

Об'єктивну відповідь оцінювали за критеріями BOOЗ за методом RECIST (табл. 3): повна регресія пухлини (CR) — повна відсутність вимірюваної пухлини; часткова регресія пухлини (PR) — регресія пухлини більша за 30%; стабілізація захворювання (SD) — регресія пухлини менша за 30% або відсутність змін у розмірах пухлини.

Таблиця 3

Об'єктивна відповідь	Об'єктивний ефект після проведення НХТ		
	1-ша (n = 32), n (%)	2-га (n = 29), n (%)	3-тя (n = 28), n (%)
Повна регресія (CR)	2 (6,3 ± 4,3)	2 (6,9 ± 4,7)	8 (28,6 ± 8,5) <sup>а,б</sup>
Часткова регресія (PR)	21 (65,6 ± 8,4)	20 (79,3 ± 7,5)	19 (67,8 ± 8,8)
Стабілізація хвороби (SD)	8 (25,0 ± 7,7)	4 (13,8 ± 6,4)	1 (3,6 ± 3,5) <sup>а</sup>
Прогресування хвороби	1 (3,1 ± 3,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

<sup>а</sup>Різниця вірогідна відносно показника 1-ї групи ( $p < 0,05$ ); <sup>б</sup>різниця вірогідна відносно показника 2-ї групи ( $p < 0,05$ ).

При дослідженні ефективності лікування хворих на РМЗ встановлено, що CR у 1-й групі відзначено у 2 пацієток (6,3 ± 4,3%), у 2-й та 3-й — відповідно у 2 (6,9 ± 4,7%) та 8 (28,6 ± 8,5%). PR виявлено в усіх 3 групах, але з певною різницею у показниках: у 1-й — у 21 хворої (65,6 ± 8,4%), у 2-й — 20 (79,3 ± 7,5%), у 3-й — 19 (67,8 ± 8,8%). Вірогідне збільшення загальної об'єктивної відповіді (CR + PR) визначено у хворих 2-ї та 3-ї груп (86,2 та 96,4%) порівняно з пацієнтами 1-ї групи (71,9%).

При порівняльній оцінці побічних ефектів також виявлена достовірна різниця (табл. 4). При зіставленні мієлотоксичності схем НХТ лейкопенію III–IV ст. відзначали у 8 (25,0 ± 7,7%) хворих 1-ї групи, 3 (10,3 ± 5,7%) — 2-ї та у 1 (3,6 ± 3,5%) — 3-ї.

Таблиця 4

Побічні ефекти	Порівняльна оцінка побічних ефектів після проведення НХТ		
	1-ша (n = 32), n (%)	2-га (n = 29), n (%)	3-тя (n = 28), n (%)
Лейкопенія III–IV ст. токсичності	8 (25,0 ± 7,7)	3 (10,3 ± 5,7)	1 (3,6 ± 3,5) <sup>*</sup>
Нудота/блювота III–IV ст. токсичності	3 (9,4 ± 5,2)	1 (3,4 ± 3,4)	1 (3,6 ± 3,5)
Больові відчуття у грудній клітині	0 (0,0)	3 (10,3 ± 5,7)	2 (7,1 ± 4,9)
Поверхневий епітеліт	0 (0,0)	2 (6,9 ± 4,7)	1 (3,6 ± 3,5)

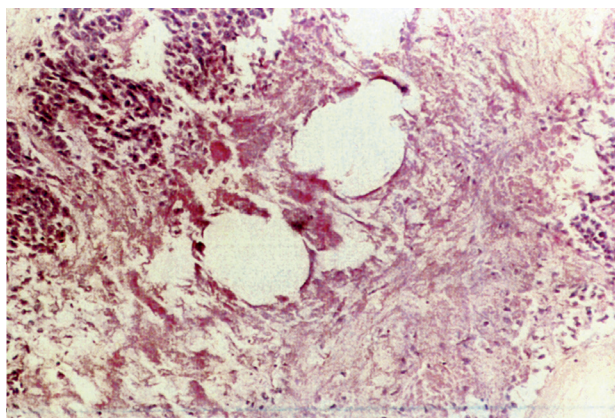
<sup>\*</sup>Різниця вірогідна відносно показника 1-ї групи ( $p < 0,05$ ).

Випадків субфебрильної нейтропенії під час лікування не зафіксовано. При оцінці побічних ефектів НХТ суттєвих ознак системної токсичності під час проведення ВАПХТ за даною методикою не зареєст-



ровано. У 3 (9,4 ± 5,2%) пацієток під час проведення в/в ПХТ відзначали нудоту/блювання III–IV ст., що потребувало призначення антиеметичних препаратів, засобів дезінтоксикаційної терапії. При застосуванні ВАПХТ диспептичні явища мали транзиторний характер за інтенсивністю та тривалістю і не потребували значної медикаментозної корекції. 5 пацієток з 2-ї і 3-ї груп скаржилися на больові відчуття у ділянці грудної клітки при повторних курсах ВАПХТ, що, імовірно, пов'язано з мікротромбозом дрібних судин. Через 1–2 тиж після проведення ВАПХТ у 2 хворих (6,9 ± 4,7%) у 2-й групі та у 3 (3,6 ± 3,5%) — 3-й групі визначали поверхневий епітеліт у вигляді гіперемії шкіри молочної залози, який з часом зникав без виникнення рубців, залишаючи осередки гіперпігментації шкіри. Хімічних опіків та некротичних змін не відзначали.

Заслужують на особливу увагу виявлені при мікроскопічному дослідженні РМЗ відмінності у розвитку терапевтичного патоморфозу (табл. 5, рис. 1–5). Порівнянно з контролем, де зареєстровані лише дрібноосередковані локальні некрози окремих ракових клітин та їх груп (комплексів), у 2-й і 3-й групах зафіксовані більш поширені зміни РМЗ, переважно периваскулярної локалізації. Незворотня альтерація виникала навколо власних судин карцином (рис. 1) з явищами мікротромбозу (рис. 2) та геморагічної імбібії паренхіматозно-стромальних структур РМЗ з їх втратою (рис. 3). Виходячи з таких особливостей лікувального патоморфозу (див. рис. 1, 2, 3) є очевидним факт переносу молекул ХП через стінки судин у пухлинні клітини та оточуючу їх строму. З часом через 2–3 тиж після ВАПХТ у хворих 2-ї та 3-ї груп некротичні ділянки поєднуються з розростанням сполучної тканини, внаслідок чого вміст непухлинного компоненту значно домінує над резидуальним пухлинним (рис. 4). Логічне питання щодо визначення порівняльної ефективності ВАПХТ у хворих 2-ї та 3-ї груп, що оцінювали на підставі кількісного підрахунку (табл. 5) залишкового пухлинного компонента — структурно збережених ракових клітин без ознак альтерації ядерного апарату (патологічних мітозів, апоптозу), що дозволяло такі клітини вважати потенційно спроможними до проліферації.



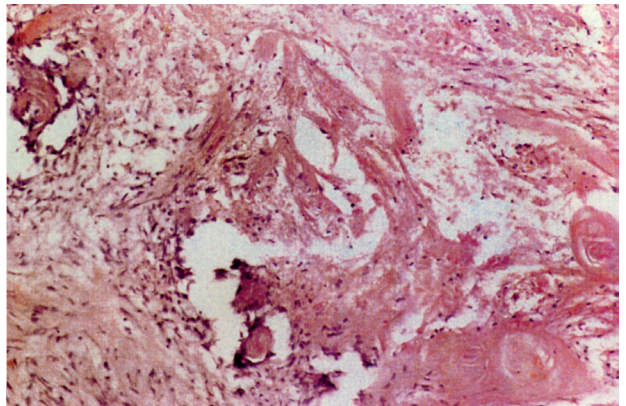
**Рис. 1.** Поширена зона некрозу навколо двох судин РМЗ. Стан після кальцієвої модифікації ВАПХТ. Гематоксилін-еозин. 36. × 200

**Таблиця 5**  
Порівняльна ефективність НПХТ за результатами вивчення життєздатного резидуального пухлинного компоненту (ЖРПК)

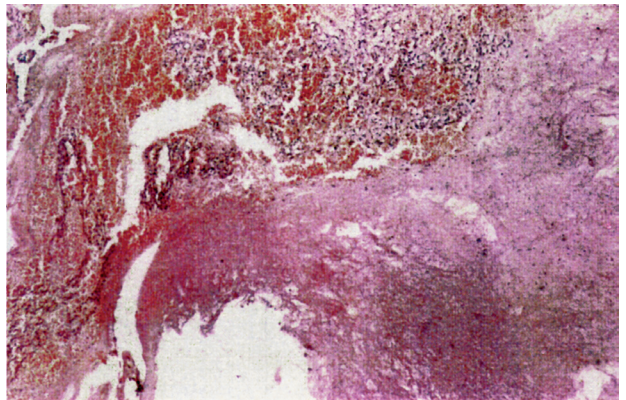
Контроль (n = 30)	Дольовий вміст ЖРПК (M ± m, %)		
	1-ша група (n = 32)	2-га група (n = 29)	3-тя група (n = 28)
62,2 ± 6,3	56,8 ± 5,8	40,1 ± 4,2	8,4 ± 1,3 <sup>a, b, c</sup>

<sup>a</sup>Різниця вірогідна відносно показника контрольної без неoad'ювантного лікування) групи (p < 0,05); <sup>b</sup>різниця вірогідна відносно показника 1-ї групи (p < 0,05); <sup>c</sup>різниця вірогідна відносно показника 2-ї групи (p < 0,05).

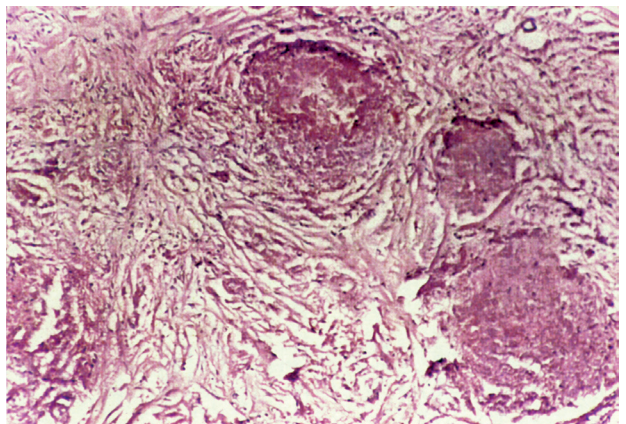
Аналіз отриманих даних переконливо свідчить, що системна в/в НХТ є недостатньо ефективною, оскільки не приводить до суттєвого збільшення кількості пухлинних клітин з виходом в апоптоз.



**Рис. 2.** Мікротромбоз, некроз РМЗ. Стан після кальцієвої модифікації ВАПХТ. Гематоксилін-еозин. 36. × 200

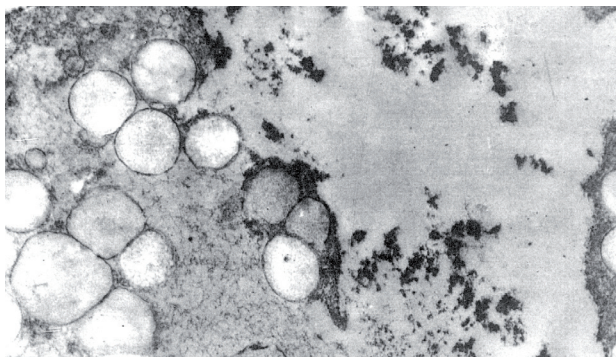


**Рис. 3.** Геморагічна інфільтрація РМЗ з втратою паренхіматозно-стромальної будови. Стан після кальцієвої модифікації ВАПХТ. Гематоксилін-еозин. 36. × 200

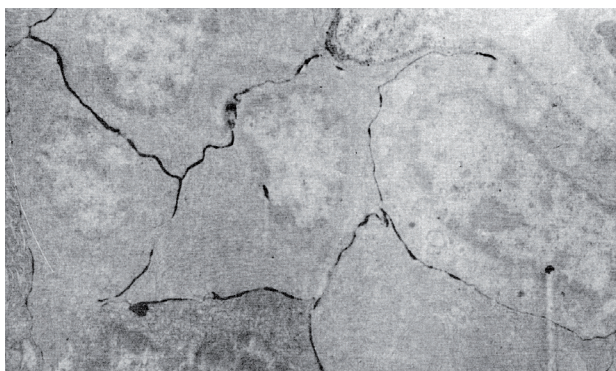


**Рис. 4.** Некрози РМЗ в оточенні розростань сполучної тканини. 3 тиж після кальцієвої модифікації ВАПХТ. Гематоксилін-еозин. 36. × 200

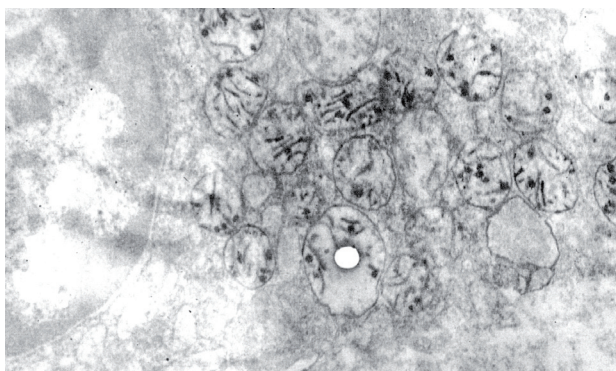




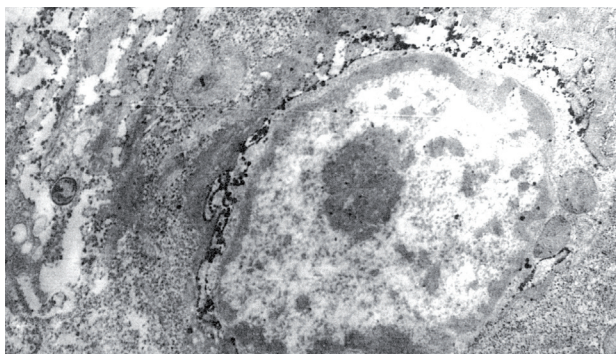
**Рис. 5.** Електронно-щільні гранули лантану в позаклітинному просторі і на плазмалемі пухлинної клітини. Контроль (операційний матеріал пацієнтки, якій не проводили неoad'ювантне лікування). 36. × 6000



**Рис. 6.** Лінійні преципітати лантану контрастують контури плазмалем декількох суміжних пухлинних клітин. Контроль (операційний матеріал пацієнтки, якій не проводили неoad'ювантне лікування). 36. × 12 000



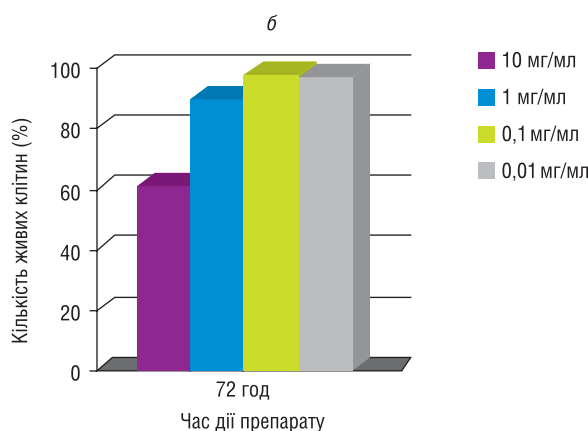
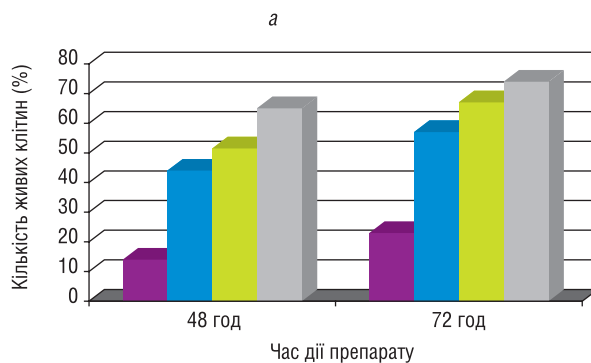
**Рис. 7.** Гранулярні та лінійні преципітати лантану в мітохондріях. Стан після кальцієвої модифікації ВАПХТ. 36. × 20 000



**Рис. 8.** Преципітати лантану на каріолемі ядра пухлинної клітини. Стан після кальцієвої модифікації ВАПХТ. 36. × 15 000

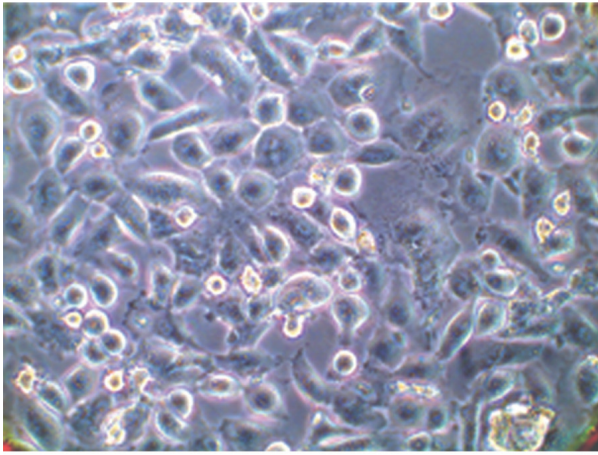
Вірогідна ефективна антибластомна дія визначається у 2-й і 3-й групах при порівнянні з групою контролю. Найбільш поширена (порівняно не тільки з контролем, але й з 1-ю та 2-ю групами) девіталізація ділянок РМЗ із втратою спроможності до подальшої репродукції ракових клітин зафіксована у 3-й групі. Виходячи з особливостей лікувального патоморфозу РМЗ, відзначених у хворих, які отримували ГК, ми вважали за доцільне з'ясувати механізми розвитку такого високого хіміотерапевтичного ефекту цієї схеми.

Беручи до уваги значну роль  $\text{Ca}^{2+}$  як модулятора проліферації клітин та апоптозу, логічно проаналізувати можливість кальцієвого перевантаження як дієвого механізму ефективності схем лікування з використанням ГК. З цією метою застосований метод контрастування ультратонких зрізів РМЗ іонами рідкоземельного металу  $\text{La}^{3+}$ . Він є одним з найкращих маркерів мембранної проникності клітин, що застосовують в електронній мікроскопії (розмір часточок 0,114 нм), контрастує надмембранні структури клітин (глікокалікс) і є трейсером-пенетрантом для тих клітин, у яких відбувалась альтерація глікокаліксу і/або їх зовнішніх мембран (плазмалем). У рамках виконаної науково-дослідної роботи «Вивчення морфологічних основ патології мембран клітин пухлин та особливостей їх лікувального патоморфозу» (1989–1991 рр.) в Інституті онкології доведено, що катіони лантану в інтактних клітинах (без неoad'ювантного впливу) розподіляються у вигляді чисельних електронно-щіль-

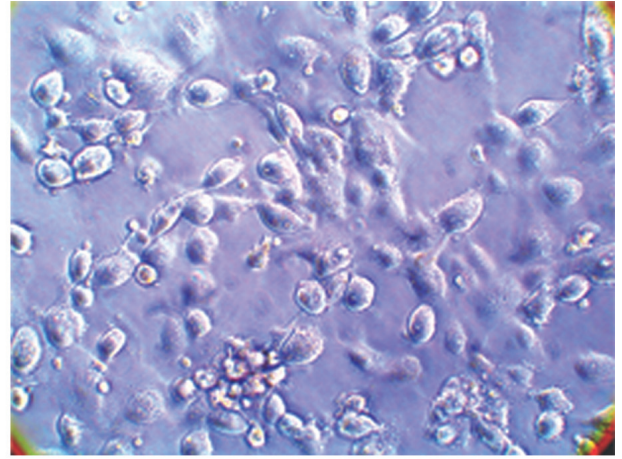


**Рис. 9.** Вплив ГК на проліферацію клітин ліній MCF-7 (а) і T-47D (б)

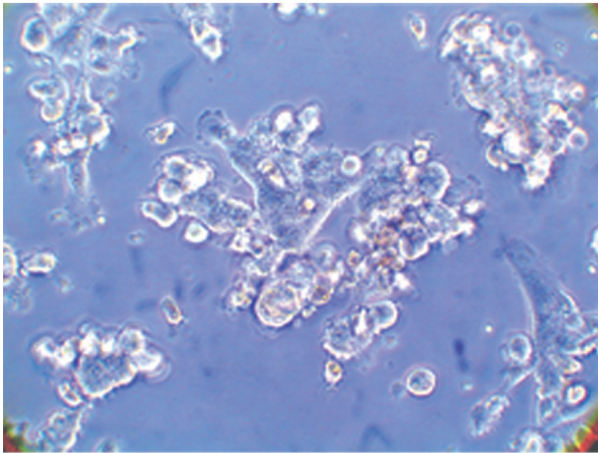




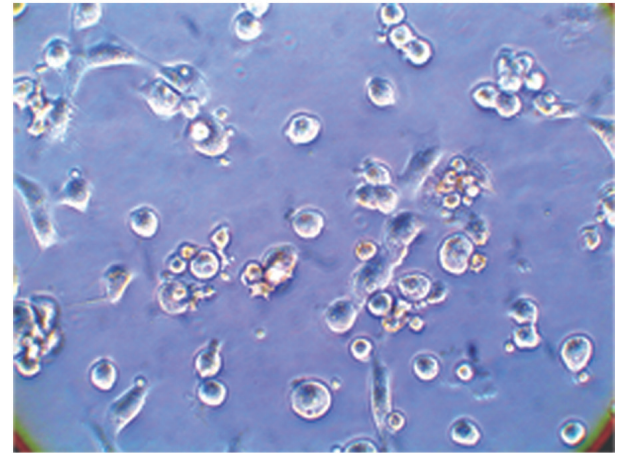
а



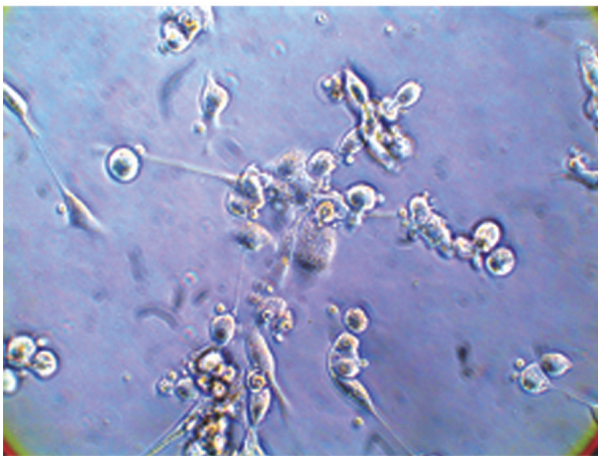
б



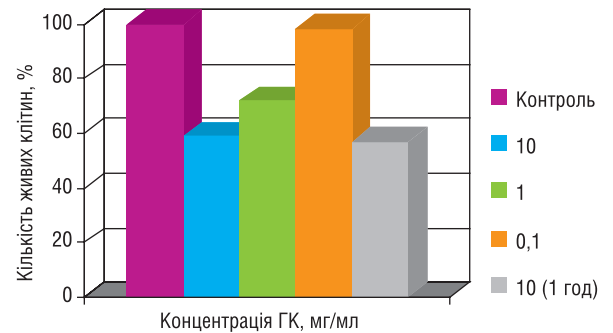
в



г



д



е

**Рис. 10.** Морфологія та проліферативна активність первинних культур клітин з плеврального ексудата пацієнток з РМЗ при дії *in vitro* ГК: а — контрольна культура; б — ГК 0,1 мг/мл; в — ГК 1 мг/мл; г — 10 мг/мл; д — ГК 10 мг/мл (короткочасна обробка протягом 1 год щоденно); е — діаграма цитотоксичної дії ГК у різних концентраціях та протягом різного часу. Облік результатів проводився через 3 доби після початку дослід. Живі культури. 36. x 320

них гранулярних часточок у міжклітинних просторах (рис. 5), утворюють лінійні преципітати ззовні плазмалем, контрастуючи їх (рис. 6); при застосуванні гіпертермії, опромінення, фармакоагентів-цитостатиків, покривний глікокалікс стоншується, аж до втрати в окремих локусах плазмалем з ви-

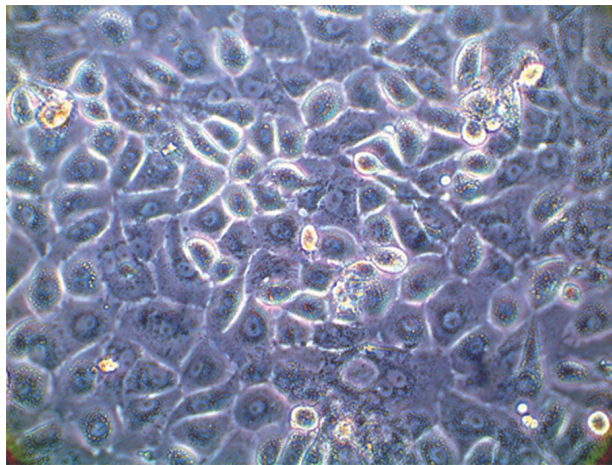
никненням дефектів (пошкодження фосфоліпідів), через які відбувається підвищений внутрішньоклітинний вхід лантанових мікрочасточок. Відомо, що в локусах зв'язування лантану органами клітин,  $La^{3+}$  заміщує собою катіони  $Ca^{2+}$  [37], тобто за топографією розподілу лантану можна судити про ло-



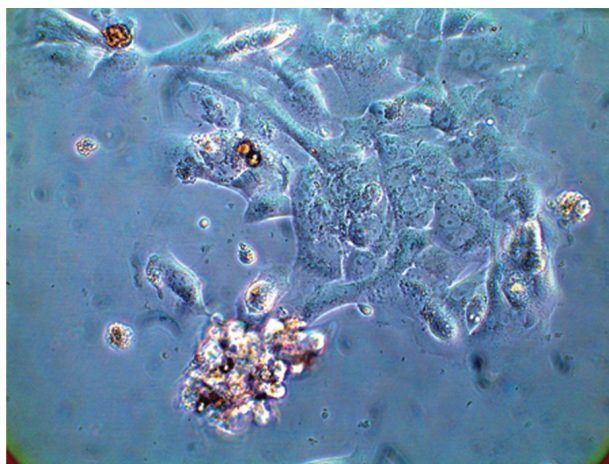
калізацію кальцію, оскільки локуси їх накопичення є ідентичними [38]. При виконанні даної роботи встановлено, що в 3-й групі обробка лантаном препаратів пухлин призводить до penetрації його мікрочастинок у цитоплазму з утворенням депозитів на мембранних профілях ендоплазматичної сітки, мітохондрій (рис. 7) та каріолеми (рис. 8). Подібні результати отримано і в 2-й групі, однак з суттєвою різницею: кількість пухлинних клітин, що містять лантан у хворих 3-ї групи в 10–15 разів більше ніж у 2-й. Таким чином завдяки в/а застосуванню ГК закономірним явищем стає феномен кальцієвого переважання ракових клітин, який забезпечує підвищення входу в пухлинні клітини ХП. Звідси зрозуміло, що ГК виступає модифікатором-підсилювачем протипухлинної дії ХТ, однак поряд з цим виникає думка і про здатність ГК безпосередньо пригнічувати метаболізм ракових клітин, оскільки гіпернакопичення кальцію на профілях мембран ендоплазматичної сітки, мітохондріях та ядер призводить до синтетичних, енергетичних та генетичних порушень, навіть до «кальцієвої смерті» пухлинних клітин, зокрема з утворенням кальцифікатів. Останні, як загальновідомо, є морфологічним маркером структурних незворотніх змін у клітинах.

Результати експериментів *in vitro* свідчать, що ГК дійсно пригнічує проліферацію пухлинних клітин при постійній його присутності в ростовому середовищі у концентрації від 10 мг/мл до 0,1 мг/мл (рис. 9–11). Особливістю його дії є відсутність прямого токсичного ефекту на клітини навіть при високій концентрації — переважно відзначають лише пригнічення проліферації, що відзначають уже на першу добу інкубації. Максимальний ефект ГК відзначають через 48–72 год після внесення препарату. Клітини різних ліній відрізняються за чутливістю до ГК. Так, клітини лінії MCF-7 виявились більш чутливими до ГК, ніж клітини лінії T-47D (рис. 9а, б). Пухлинні клітини з біоптатов також чутливі до антипроліферативної дії ГК. На рис. 10а, б, в, г показано, що підвищення концентрації ГК супроводжується не тільки пригніченням проліферації, але й загибеллю клітин. Як вищезазначено, за схемою клінічного використання ГК вводиться хворим щоденно в/а, створюючи протягом щонайменш 1 год достатньо високу його концентрацію в крові, що поступає в пухлину. У зв'язку з цим *in vitro* ми спробували відтворити аналогічні умови дії ГК на пухлинні клітини — їх піддавали короткочасному впливу ГК у підвищеній концентрації (протягом 1 год), після чого ГК видаляли, змінюючи середовище. Цю процедуру повторювали щоденно протягом 9 днів. У контрольних клітинах лише проводили заміну середовища. Виявлено, що навіть короткочасна дія ГК у високій концентрації на клітини приводить до різкого пригнічення їх проліферативної активності: вже протягом перших діб відбувається рефракція моношару клітин

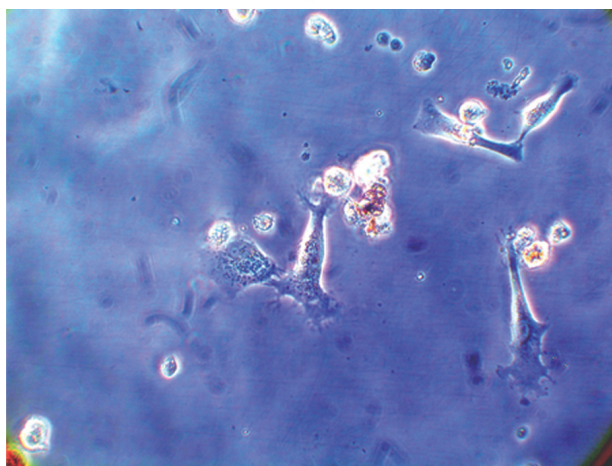
у культурі і пригнічення їх ділення з поступовою загибеллю (див. рис. 10е, рис. 11). Через 7–9 діб у дослідній культурі залишаються лише поодинокі клітини або їх острівки (рис. 11б, в). Цитологічний аналіз пухлинних клітин показав, що вже на першу добу після дії ГК у культурі відзначають появу великої кількості конденсованих клітин з гіперх-



а

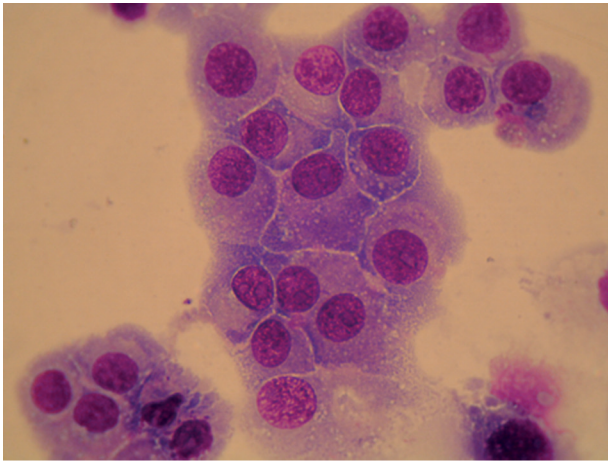


б

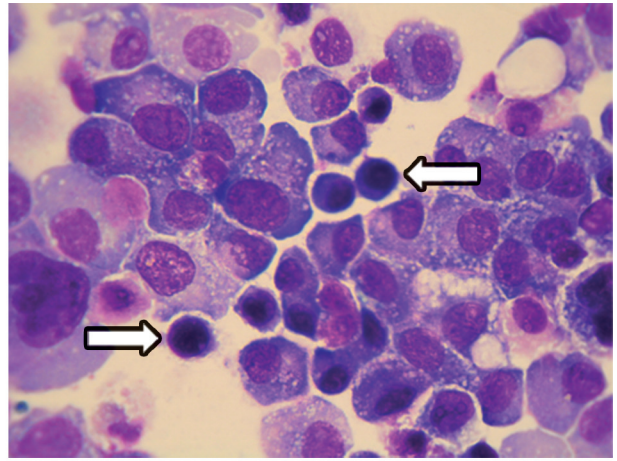


в

**Рис. 11.** Вплив *in vitro* ГК у високій концентрації (20 мг/мл протягом 1-ї години, повторення процедури — 9 днів) на клітини РМЗ: а — контрольна культура; б, в — дослідні культури



а

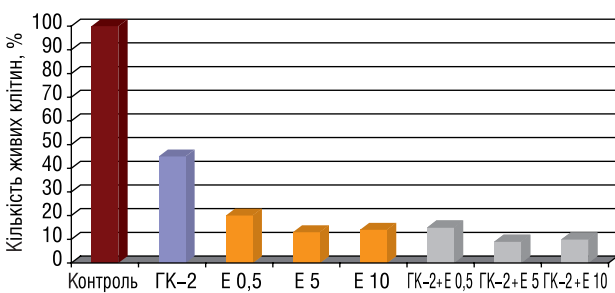


б

**Рис. 12.** Вплив ГК на клітини лінії MCF-7: а — контроль; б — ГК (1 мг/мл, 48 год). Забарвлення за Папенгеймом (цитоспінові препарати; конденсовані клітини позначені стрілками).  $36 \times 1000$

ромним ядром і вузькою зоною цитоплазми, що може вказувати на загибель клітин за механізмом апоптозу (рис. 12).

Відомо, що препарати глюконатів металів, зокрема ГК, здатні знижувати токсичну дію антрациклінових антибіотиків [39–42]. У наших експериментах також показано, що включення до терапевтичних схем ГК супроводжується значним зниженням мієлотоксичних проявів ХТ. Виникає питання відносно модифікації ГК специфічної протипухлинної дії цитостатиків на клітини РМЗ. У зв'язку з цим досліджено на моделі клітин лінії MCF-7 комбіновану дію ГК і антрациклінів на пухлинні клітини *in vitro*. Доведено, що ГК, подібно до інших глюконатів [41–42], не впливає на специфічну активність цитостатика і навіть сам має певну цитотоксичну активність проти пухлинних клітин (рис. 13).



**Рис. 13.** Комбінована дія ГК (1 мг/мл, 48 год) та епірубіцину (0,5; 5 та 10 мкг/мл, 48 год) на клітини РМЗ людини лінії MCF-7

## ВИСНОВКИ

1. Результати проведених досліджень демонструють, що розроблена нами нова схема ХТ у поєднанні з використанням у неoad'ювантному режимі в/а ГК достовірно підвищує ефективність лікування хворих на місцево-поширений РМЗ.

2. Клінічна доцільність застосування ГК як важливого компонента розробленої нами схеми

підтверджена в експериментальних дослідженнях з використанням культур клітин РМЗ.

## ЛИТЕРАТУРА

- Федоренко ЗП, Гулак ЛО, Горох ЄЛ та ін. Рак в Україні, 2003–2004. Захворюваність, смертність, виживаність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл Націон канцер-реєстру України. К: 2005; (6): 97.
- Сеноточив РВ, Ташук ВІ, Станкевич ВВ. Скринінг раку молочної залози. Рута, Чернівці. 1999. 200 с.
- Зотов АС, Велик ЕО. Мастопатии и рак молочной железы. МЕДпресс-информ, М, 2005. 111 с.
- Штерег Г. Адьювантная, неоадьювантная и палиативная химиотерапия рака молочной железы. Onco view (онкологическое обозрение). 2006; (2): 10–7.
- Гольдгирш А, Глик ДжГ, Гельбер РД и др. Международный консенсус по первичной терапии раннего рака молочной железы. Ст-Галлен, Швейцария, 2005 г. Onco view (онкологическое обозрение) 2006; (2): 23–38.
- Kim R, Osaki A, Toge T. Current and future roles of neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer. Clin Breast Cancer 2005; 6 (suppl 3): 223–32.
- Maraz R, Boross G, Svebis M, et al. Response rates following neoadjuvant chemotherapy and breast preserving treatment in patients with locally advanced breast cancer. Magy Seb 2005; 58 (suppl 4): 225–32.
- Schwartz G. Neoadjuvant induction chemotherapy. Minerva Ginecol 2005; 57 (suppl 3): 327–48.
- Insa A, Chirivella I, Lluch A. Neoadjuvant therapy for operable breast-cancer. Med Clin (Barc) 2006; 126 (8): 295–303.
- Suzuki E, Toi M. Neoadjuvant Chemotherapy in breast cancer. Nippon Rinsho 2006; 64 (3): 536–9.
- Kaufmann M, von Minckwitz G, Rody A. Preoperative (neoadjuvant) systemic treatment of breast cancer. Breast 2005; 14 (6): 576–81.
- Moon YM, Rha SY, Jeung HC, et al. Neoadjuvant chemotherapy with infusional 5-fluorouracil, adriamycin and cyclophosphamide (iFAC) in locally advanced breast cancer: an early response predicts good prognosis. Ann Oncol 2005; 16 (11): 1778–85.
- Бондар ГВ, Седаков ІС, Шлопов ВГ. Первинно-неоперабельний рак молочної залози. Донецьк: Каштан, 2005. 347 с.
- Югрінов ОГ, Литвиненко ОО, Тельний ВВ и др. Неоад'ювантна селективна внутрішньо артеріальна хіміотерапія місцево поширеного раку молочної залози. Променева діагностика, променева терапія 2004; (4): 32–7.



15. **Takatsuka Y, Shin E, Kikkawa N.** A clinical trial of neoadjuvant intraarterial chemotherapy for the treatment of locally advanced breast cancer. *Gan To Kagaku Ryolo* 1996; **23** (11): 1523–5.
16. **Matsumoto Y, Terakado H, Ikawa M, et al.** Intra-arterial infusion chemotherapy for breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1996; **23** (11): 1526–8.
17. **Roversi R, Rossi G, Ricci S, Roversi M, et al.** Intra-arterial antitlastic treatment of breast carcinoma. *Radiol Med (Torino)* 1998; **95** (3): 211–6.
18. **Morandi C, Colopi S, Cantore M, et al.** Intra-arterial chemotherapy in locally advanced or recurrent breast neoplasma. *Radiol Med (Torino)* 1996; **92** (1–2): 101–4.
19. **Chang HT, Mok KT, Tzeng WS, et al.** Induction intraarterial chemotherapy for T4 breast cancer through an implantable port-catheter system. *Am J Clin Oncol* 1997; **20** (5): 493–9.
20. **Toda K, Hirata K, Sato T, et al.** Histological evaluation of the effects of intraarterial chemotherapy for advanced breast cancer: a long-term followup study with respect to the survival. *Surg Today* 1998; **28** (5): 509–16.
21. **Stephens FO.** Intraarterial induction chemotherapy in locally advanced stage III breast cancer. *Cancer* 1990; **15** (4): 645–50.
22. **Скляр СЮ.** Ефективність застосування селективної рентгеноваскулярної внутрішньоартеріальної поліхіміотерапії при лікуванні хворих на рак молочної залози. *Онкологія* 2006; **8** (2): 196–200.
23. **Nicolato A.** Intra-arterial Regional Chemotherapy and intensive locoregional Radiotherapy in the Treatment of locally Advanced cancer of Breast. *Radiol Med (Torino)* 1990; **80** (3): 347–51.
24. **Murakami M, Yoden E, Kono K, et al.** Experience in treatment of patients with locally advanced or recurrent breast cancer: intraarterial infusion chemotherapy combined with radiotherapy. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 1997; **57** (4): 189–94.
25. **Kramer S, Gorich J, Hasan I, et al.** Superselective intra-arterial chemotherapy in therapy-refractory lymph node recurrences of breast carcinoma. *Rofo* 1996; **164** (5): 422–6.
26. **Gorich J, Hasan I, Majdali R.** Previously treated, locally recurrent breast cancer: treatment with superselective intraarterial chemotherapy. *Radiology* 1995; **197** (1): 199–203.
27. **Nitz U, Havenith B, Rost B, et al.** Locoregional intra-arterial chemotherapy of primary incurable local recurrence of breast cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1993; **53** (11): 760–7.
28. **Takatsuka Y, Okamura Y, Kawahara T, et al.** A long-term follow-up study of intra-arterial infusion chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1990; **17**: 1682–6.
29. **Таругинов ВИ.** Молочная железа: рак и предраковые заболевания. К, 2006. 415 с.
30. **Schonherr R.** Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *J Membr Biol* 2005; **205** (3): 175–84.
31. **Berube S, Diorio C, Verhoek-Oftedahl W, Brisson J.** Vitamin D, calcium, and mammographic breast densities. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; **13** (9): 1466–72.
32. **Sergeev I.** Calcium as a mediator of 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced apoptosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; **89–90** (1–5): 419–25.
33. **Sergeev I.** Calcium signaling in cancer and vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **97** (1–2): 145–51.
34. **O’Kelly J, Koeffler HP.** Vitamin D analog and breast cancer. *Recent Results Cancer Res* 2003; **164**: 333–48.
35. **Ganapathy V, Shyamala Devi C.** Effect of histon H1 on the cytosolic calcium levels in human breast cancer MCF-7 cells. *Life Sci* 2005; **76** (22): 2631–41.
36. **Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al.** New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990; **82** (13): 1107–12.
37. **Shanlai M, Tavassoli M.** Lanthanum as an Electron Microscopi stain. *J Histochem and Cytochem* 1982; **30** (12): 1325–30.
38. **Doggenweiler C, Frenk S.** Staining properties of lanthanum on cell membranes. *Proc Natl Acad Sci* 1965; **53**: 425.
39. **Богуш ТА, Смирнова ГБ, Вихлянцева НО, Сыркин АБ.** Влияние глюконата кальция на острую и хроническую токсичность доксорубина у мышей. Антибиотики и химиотерапия 1997; **42** (1): 17–22.
40. **Богуш ТА, Смирнова ГБ, Вихлянцева НО, Сыркин АБ.** Влияние глюконата кальция на токсичность и противоопухолевую активность доксорубина у мышей. Антибиотики и химиотерапия 1999; (1): 6–10.
41. **Кутняк ВП, Кудрявещ ЮЙ, Горчакова НО та ін.** Кардіопротекторна ефективність ритмокору при застосуванні антрациклінових антибіотиків. *Науковий вісник НМУ* 2006; (3): 68–71.
42. **Конкина ИГ, Иванов СП, Князева ОА и др.** Физико-химические свойства и фармакологическая активность глюконатов Mn (II), Fe (II), Co (II), Cu (II) и Zn (II). *Химико-фармацевтический журн* 2002; **36** (1): 18–21.
43. **Автандилов ГТ.** Медицинская морфометрия. М: Медицина, 1990. 383 с.

## MODIFYING OF CHEMOTHERAPY OF PATIENTS SUFFERING FROM LOCALLY ADVANCED BREAST CANCER

*O.F. Ligrda, K.O. Galahin, I.I. Smolanka, Y.I. Kudryavets, N.A. Bezdeneshnih, E.R. Deneka, N.F. Ligrda, V.V. Sorokina*

**Summary.** Findings of the treatment of advanced breast cancer using neoadjuvant systemic-selective PCT in combination with chemomodifier (calcium gluconate) are presented. The obtained data of experimental studies using cell cultures of BC in vitro as well as immediate results of the treatment support expediency and safety for use of calcium gluconate as an important component of our schedule.

**Key Words:** breast cancer, intra-arterial chemotherapy, neoadjuvant chemotherapy, calcium gluconate.