

**Т.Ю. Хричкова, В.Е. Гольдберг, В.В. Жданов, Д.Н. Попов, С.А. Тузиков, С.Г. Афанасьев, А. М. Дыгай**

## **МЕХАНИЗМЫ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЦИСПЛАТИНА И КСЕЛОДЫ В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ДИСSEМИНИРОВАННЫМ РАКОМ ЖЕЛУДКА**

ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск  
ГУ НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Томск

Изучали токсические эффекты нового режима послеоперационной химиотерапии диссеминированного рака желудка IV стадии в отношении системы крови. При проведении химиотерапии по схеме, включающей цисплатин и кселоду, наблюдалось угнетение гранулоцитарного и активация эритроидного ростков гемопоэза. Отличия в реакциях ростков кроветворения обусловлены тем, что в их основе лежат разные механизмы, в частности, снижение клеточности гранулоцитарного ростка связано с замедлением созревания КОЕ-ГМ, в то время как возрастание количества эритроидных предшественников происходит при практически нормальной интенсивности дифференцировки КОЕ-Э.

**Ключевые слова:** химиотерапия, грануломоноцитопоз, эритропоэз, кроветворные предшественники

Рак желудка сохраняет одно из ведущих мест в структуре онкологической заболеваемости и смертности. При этом большинство пациентов, поступаая на лечение, имеют уже местнораспространенную либо диссеминированную фазу заболевания. На сегодняшний день ведущим в лечении пациентов с I-III стадиями заболевания однозначно остается хирургический метод [3]. Однако при IV стадии рака желудка общепризнанным является комбинированный подход: сочетание условно-радикального или паллиативного хирургического лечения, с целью уменьшения опухолевой массы, с последующей лекарственной терапией, что увеличивает продолжительность жизни больных и улучшает ее качество [10, 12]. Несмотря на вышесказанное, до сих пор не определена оптимальная схема цитостатического лечения диссеминированного рака желудка.

В связи с этим большой интерес представляет новый режим комбинированной сочетанной химиотерапии, разработанный в НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН. Проведенные клинические исследования показали более выраженный и длительный противоопухолевый эффект с улучшением показателей функциональной шкалы, общего статуса здоровья и снижением симптомов заболевания в случае применения предложенного способа лечения, включающего, наряду с опера-

тивным вмешательством, назначение цисплатина и кселоды, по сравнению с исключительно паллиативной хирургической операцией [9].

В то же время противоопухолевая химиотерапия вызывает ряд побочных реакций, связанных с токсическим действием цитостатических препаратов на активно обновляющиеся клеточные системы организма [6]. При этом к наиболее частым осложнениям относится лейкопения с преимущественным снижением в периферической крови количества нейтрофильных гранулоцитов, которые, с одной стороны, обеспечивают защиту организма от разного рода инфекций, а с другой — участвуют в формировании противоопухолевой резистентности.

В связи с этим представляется актуальным изучение механизмов, лежащих в основе токсического действия как уже существующих, так и вновь создаваемых режимов химиотерапии на систему крови.

Целью настоящего исследования явилось изучение токсических эффектов нового режима послеоперационной химиотерапии диссеминированного рака желудка в отношении системы крови и механизмов их развития.

### **Методика**

В ходе работы были обследованы 32 больных с морфологически верифицированным раком

желудка IV стадии после паллиативных хирургических операций. Все пациенты получали противоопухолевую полихимиотерапию по следующей программе в адъювантном режиме: цисплатин (Bristol-Myers Squibb, Italy) 30 мг/м<sup>2</sup> интраперитонеально в 1-е и 4-е сутки после операции, кселода (Хоффманн-Ля Рош, Швейцария) 2500 мг/м<sup>2</sup> per os с 1-х по 14-е сутки и цисплатин 50 мг/м<sup>2</sup> внутривенно в 8-й и 15-й день с момента начала приема кселоды. Показатели системы крови оценивались на протяжении трех курсов химиотерапии, перерыв между курсами составлял 3 недели.

Материал для исследования (капиллярную и венозную кровь) забирали до и после каждого цикла цитостатического лечения. Проведение стерильных пункций осуществляли перед хирургическим воздействием, а также перед II и III курсами химиотерапии.

Определение показателей периферической крови (гемоглобин, эритроциты, лейкоциты, гемограмма) и дифференциальный подсчет миелограмм в стерильном пунктате производили

стандартными гематологическими методами [5]. Клонирование клеток-предшественников грануломоноцитопоза (КОЕ-ГМ) и эритропоэза (КОЕ-Э) из неприлипающих кариоцитов костного мозга больных (концентрация клеток  $2,0 \times 10^5$  мл) осуществляли в полувязкой питательной среде следующего состава: 80% среды McCoу 5A, 19% эмбриональной телячьей сыворотки, 280 мг/л гентамицина («Serva», Германия),  $0,4 \times 10^5$  М 2-меркаптоэтанол («Sigma», США), 5 мкг/л рекомбинантного Г-КСФ («Нейпоген», Hoffman-La Roche, Швейцария) для гранулоцитарных колоний либо 0,5 Ед/мл рекомбинантного эритропоэтина («Sigma», США) для эритроидных. По 2,0 мл приготовленной взвеси помещали в пластиковые 35 мм чашки Петри и инкубировали 7 суток (КОЕ-ГМ) либо 3 суток (КОЕ-Э) при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности воздуха. Подсчет выросших колоний производили на инвертоскопе «Биолам-П 1» (ув. 56×), при этом под колонией подразумевали клеточный агрегат, содержащий не менее 50 нуклеаров, а под кластером не менее

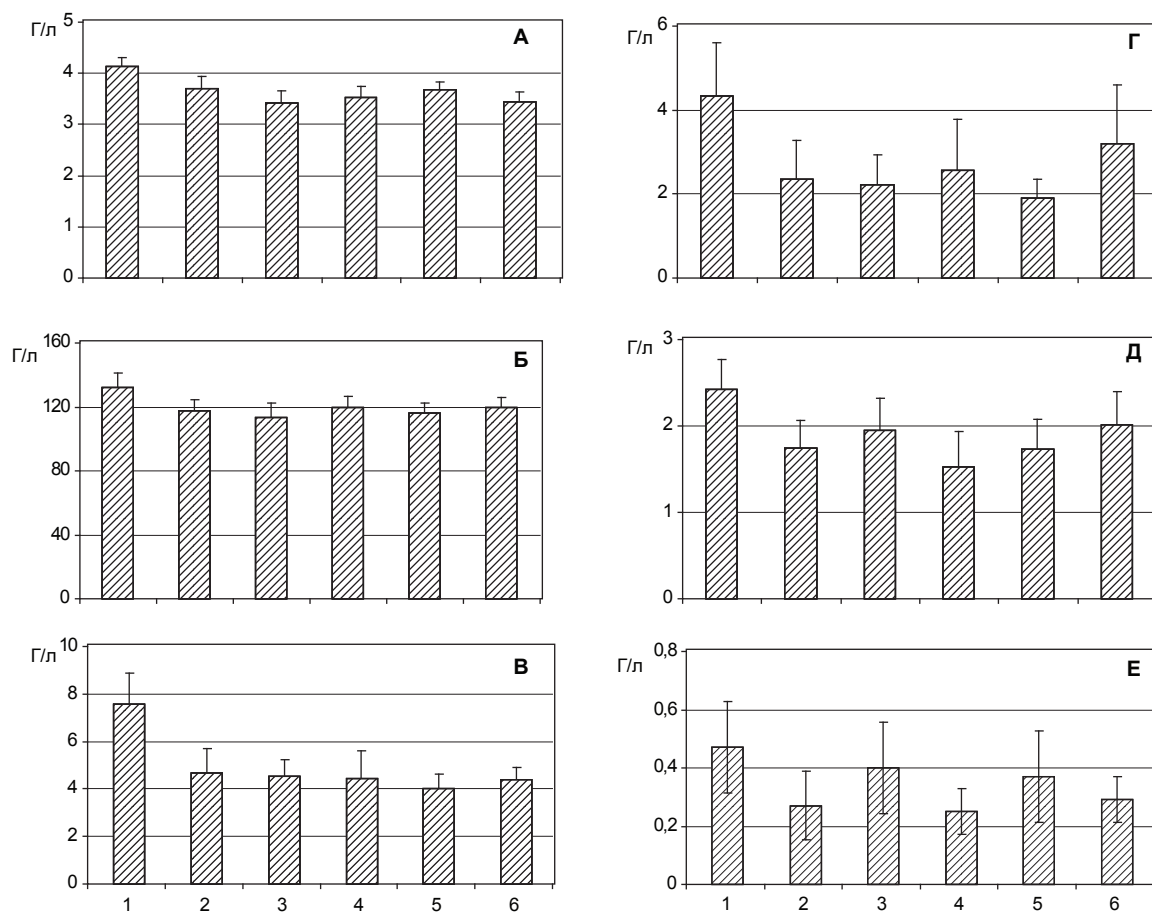


Рис. 1. Изменения содержания эритроцитов (А), концентрации гемоглобина (Б), общего количества лейкоцитов (В), содержания сегментоядерных нейтрофилов (Г), лимфоцитов (Д) и моноцитов (Е) в периферической крови у больных раком желудка IV стадии в динамике послеоперационной химиотерапии цисплатином и кселодой

По оси абсцисс — сроки исследования (1 — до лечения, 2 — после первого курса, 3 — перед вторым курсом, 4 — после второго курса, 5 — перед третьим курсом, 6 — после третьего курса), по оси ординат — значения показателя; доверительные интервалы при  $P < 0,05$

5 нуклеаров. Морфологию индивидуальных колоний изучали на специально приготовленных препаратах, которые окрашивали азур II – эозином [1, 13]. Интенсивность дифференцировки гемопоэтических предшественников определяли по величине индекса созревания (соотношение колоний и кластеров).

Статистическую обработку полученных данных проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента [7].

### Результаты

Исследование периферической крови больных с установленным диагнозом рака желудка в процессе химиотерапевтического лечения показало достоверное уменьшение числа эритроцитов во все сроки исследования относительно данных, полученных до начала терапии. Снижение содержания эритроцитов сопровождалось параллельным уменьшением концентрации гемоглобина, также статистически значимым на протяжении всего периода лечения (Рис. 1 А, Б).

Анализ стерильных пунктатов продемонстрировал наличие компенсаторных сдвигов со стороны костномозгового кроветворения. Так, уже перед началом второго курса химиотерапии содержание зрелых эритрокариоцитов в кроветворной ткани выросло на 40,2%, а к началу третьего курса цитостатического лечения превысило значение данного показателя до начала лечения более чем в 2 раза (Рис. 2 Г). Это обстоятельство, возможно, обусловлено отсутствием значительных повреждений препаратами цисплатина

и кселоды, способных к митозу предшественников эритропоэза, что создает основу для активации регенераторных процессов в костном мозге на ранних этапах цитостатической болезни [11]. Как известно, восстановление эритрона, наряду с универсальными механизмами активации кроветворения, тесно связано с процессами эритродиереза. При повреждении эритрономобластов и эритроцитов цитостатиками в циркуляцию поступают продукты их распада, способные активировать эритропоэз. Н.М. Новиковым с соавторами [8] была выдвинута гипотеза, в соответствии с которой макрофаги костного мозга, печени, селезенки и почек, захватывая фрагменты разрушенных эритроцитов и эритрокариоцитов, передают стимулирующую информацию в строму костного мозга.

Лейкоцитарное звено системы крови, как правило, страдает более других от агрессивного воздействия химиотерапевтических препаратов. Полученные нами данные полностью согласуются с общепринятыми представлениями. Так, общее количество лейкоцитов (ОКЛ) в крови пациентов закономерно уменьшилось (на 38,5% от исходного) уже после первого курса химиотерапии (Рис. 1 В). Далее в процессе цитостатического лечения происходило прогрессирующее снижение ОКЛ с минимальным уровнем (48% от исходного) перед началом третьего курса химиотерапии.

Уменьшение числа лейкоцитов было обусловлено снижением содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, в частности сегменто-

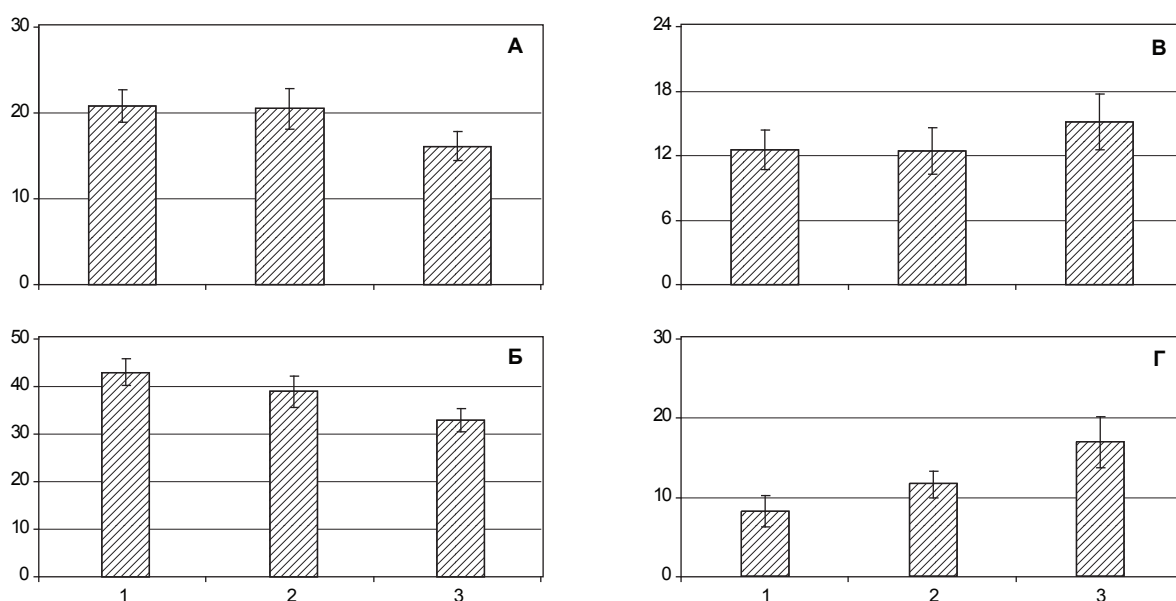


Рис. 2. Динамика содержания незрелых нейтрофильных гранулоцитов (А), зрелых нейтрофильных гранулоцитов (Б), незрелых эритроцитов (В) и зрелых эритроцитов (Г) в костном мозге у больных раком желудка IV стадии в процессе проведения послеоперационной химиотерапии цисплатином и кселодой  
По оси абсцисс — сроки проведения химиотерапии (1 — до лечения, 2 — перед вторым курсом, 3 — перед третьим курсом), по оси ординат — содержание клеток в костном мозге (%); доверительные интервалы при  $P < 0,05$

Таблица 1

**Содержание кроветворных клеток-предшественников грануломоноцито- и эритропоэза (на  $10^5$  неадгезирующих мононуклеаров) в костном мозге больных раком желудка IV стадии в динамике проведения химиотерапии по оригинальной схеме цисплатин + кселода, ( $\bar{X} \pm m$ )**

| Показатель | Сроки исследования |                |                |
|------------|--------------------|----------------|----------------|
|            | До лечения         | Перед 2 курсом | Перед 3 курсом |
| КОЕ-ГМ     | 30,32±2,15         | 25,00±3,15     | 31,85±2,69     |
| КОЕ-Э      | 24,39±1,80         | 25,58±2,86     | 35,80±4,38*    |

Примечание: \* — отличия от значения показателя до лечения достоверны ( $P < 0,05$ )

Таблица 2

**Интенсивность созревания кроветворных клеток-предшественников грануломоноцито- и эритропоэза в костном мозге больных раком желудка IV стадии в динамике проведения химиотерапии**

**по оригинальной схеме цисплатин + кселода, ( $\bar{X} \pm m$ )**

| Коэффициент созревания | Сроки исследования |                |                |
|------------------------|--------------------|----------------|----------------|
|                        | До лечения         | Перед 2 курсом | Перед 3 курсом |
| КОЕ – ГМ               | 3,77 ± 0,41        | 2,57 ± 0,32*   | 2,60 ± 0,21*   |
| КОЕ – Э                | 4,90 ± 0,33        | 4,38 ± 0,69    | 3,58 ± 0,61    |

Примечание: \* — отличия от значения показателя до лечения достоверны ( $p < 0,05$ )

ядерных нейтрофилов, в периферической крови (Рис. 1 Г, Д, Е). Депрессия ОКЛ и их отдельных морфологических форм является, по-видимому, закономерным результатом воздействия цитостатических препаратов на клеточную продукцию путем прямого повреждения пролиферирующих клеток, замедления клеточного деления из-за воздействия на синтез ДНК и РНК либо торможения созревания молодых миелокариоцитов.

Материал, полученный при помощи стерильных пункционных биопсий, подтверждает высказанное предположение. Так, уже перед началом второго курса химиотерапии наблюдается тенденция к снижению содержания как зрелых, так и незрелых нейтрофильных гранулоцитов в костном мозге больных, леченных по исследуемой программе послеоперационной химиотерапии. Наметившаяся тенденция приобретает достоверный характер к началу третьего курса лечения: число незрелых и зрелых нейтрофильных гранулоцитов уменьшается на 22,6 и 23,5% соответственно по сравнению со значениями данных показателей до начала комбинированного лечения (Рис. 2 А, Б).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что лечение выбранной комбинацией цитостатических препаратов негативно сказывается не только на состоянии периферического лейкоцитарного звена, но и вызывает выраженное опустошение гранулоцитарного ростка костного мозга. По-видимому, миелобласты - миелоциты, представляя собой интенсивно делящуюся популяцию клеток костного мозга, весьма чувствительны к токсическому действию цисплатина и кселоды, что согласуется с данными литературы [2].

В настоящее время убедительно показано, что основным звеном системы крови, обеспечивающим восполнение отдела морфологически распознаваемых гемопоэтических клеток в экстремальных ситуациях, к которым и относится цитостатическая травма, являются не полипотентные стволовые кроветворные клетки, а элементы «буферного» отдела кроветворной ткани — коммитированные и частично детерминированные прекурсоры [14]. Поэтому мы уделили особое внимание изучению клеток именно этих классов.

Динамика содержания грануломоноцитарных предшественников характеризовалась тенденцией к угнетению перед вторым курсом с последующим возрастанием перед третьим (Таблица 1). Что касается коэффициента дифференцировки, оценивающего интенсивность созревания кроветворных клеток-предшественников в костном мозге, то данный показатель в отношении грануломоноцитопоза достоверно падал и к началу второго, и к началу третьего курса химиотерапии (Таблица 2). Это обстоятельство, возможно, обусловлено включением в схему цитостатического лечения препарата из широко применяемой в клинической онкологии группы фторпиримидиновых антиметаболитов. Отличительной особенностью препаратов фторпиримидинового ряда является мощный деструктивный эффект в отношении стромальных элементов микроокружения [4]. Развивающиеся при этом нарушения структурно-функциональной организации кроветворной ткани и обуславливают собой нормального течения процессов дифференцировки гемопоэтических предшественников, что служит дополнительным фактором снижения числа морфологически иден-

тифицируемых клеток гранулоцитарного роста.

В то же время со стороны предшественников эритроидного роста кроветворения прослеживалась четкая тенденция к возрастанию, переходящая в достоверное увеличение числа КОЕ-Э перед третьим курсом химиотерапии на 46,8% от исходного уровня (Таблица 1). Таким образом, несмотря на выраженное снижение числа эритроцитов и концентрации гемоглобина в периферической крови, репродуктивная способность эритрона в условиях терапии цисплатином и кселодой остается на достаточно высоком уровне, как за счет центрального звена, так и глубокого резерва эритропоэза.

В заключение, принимая во внимание все вышесказанное, можно констатировать разнонаправленность выявленных нами изменений со стороны эритро- и грануломоноцитопоэза. Мы склонны связывать данный факт с неодинаковыми механизмами развития токсических эффектов со стороны различных ростков кроветворения, которые необходимо учитывать при разработке адекватных методов коррекции миелосупрессивных состояний в процессе комбинированного лечения больных злокачественными новообразованиями.

#### MECHANISMS OF HEMATOLOGICAL TOXICITY OF CISPLATINA AND XELODA IN THE CONDITIONS OF COMBINED THERAPY OF THE PATIENTS WITH METASTATIC CANCER GASTER

T.Yu. Khrichkova, V.E. Goldberg, V.V. Zhdanov, D.N. Popov, S.A. Tuzikov, S.G. Afanasev, A.M. Dygai

It was studied toxic effects of new regimen of postoperative chemotherapy of metastatic cancer gaster of stage IV in respect of blood system. Depression of granulocytic and activation of erythroid lineages of hemopoiesis were observed under chemotherapy conducted by the scheme with Cysplatina

and Xeloda use. Distinctions in reactions of hemopoiesis lineages were stimulated by different mechanism, in particular, decreasing cellularity of granulocytic lineage was caused by delaying maturation of CFU-GM, while rising number of erythroid precursors took place under practically normal intensity of CFU-E differentiation.

#### Литература

1. Гольдберг Е.Д. Методы культуры ткани в гематологии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов. — Томск, 1992.
2. Гольдберг Е.Д. Роль гемопозиндуцирующего микроокружения в регуляции кроветворения при цитостатических миелосупрессиях / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.В. Жданов. — Томск, 1999.
3. Давыдов М.И., Абдихакимов А.Н., Полоцкий Б.Е. и др. // Анналы хирургии. — 2002. — № 2. — С. 33-44.
4. Дыгай А.М., Жданов В.В., Поженко Н.С. и др. // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. — 2000. — Т. 129. — № 5. — С. 528-531.
5. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Е.А. Кост. — М., 1977.
6. Нейтрофилы и злокачественный рост / Лаврова В.С., Чердынцева Н.В., Васильев Н.В. и др. — Томск, 1992.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М., 1973.
8. Новиков Н.М. // Механизмы патологических реакций. — Омск, 1988. — С. 54-57.
9. Попов Д. Н., Тузиков С. А., Афанасьев С. Г. // Сибирский онкологический журнал. — 2004. — № 1 (9). — С. 46-48.
10. Чиссов В.И., Вашакмадзе Л.А., Бутенко А.В. и др. // Российский онкологический журнал. — 2003. — № 6. — С. 4-7.
11. Freedman A., Neuberg D., Mauch P. et al. // Blood. — 1997. — Vol. 90. — № 12. — P. 4996-5001.
12. Maruyama K., Kaminishi M., Hayashi K. et al. // 4<sup>th</sup> Int. Gastr. Cancer Congr. — N. Y., 2001 — Abstr. № 308. — P. 354.
13. Metcalf D. Haemopoietic colonies. — Berlin, 1977.
14. Udut V.V., Dygai A.M., Khlusov I.A. et al. // Pathophysiology. — 1997. — № 4. — P. 175-181.