

УДК 543.544.6

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИТОМИЦИНА-С В ТКАНЯХ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПОВЕРХНОСТНОГО РАКА

А.В. Пирогов, Е.Б. Пашкова, А.А. Бендрышев, Р.В. Ульянов\*, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии; e-mail: Pirogov@analyt.chem.msu.ru)

Разработана методика количественного определения митомицина-С в тканях мочевого пузыря методом градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в режиме электрораспылительной ионизации. Диапазон линейности градуировочного графика от 20 до 400 мкг/л. Предел обнаружения составил 15 нг/л. Предложена процедура пробоподготовки, представляющая собой простую экстракцию водой. Она позволяет количественно оценить содержание митомицина-С в биологических тканях. Предложенный способ был использован для определения митомицина-С в реальных образцах биологической ткани.

**Ключевые слова:** микроэмульсионная жидкостная хроматография, митомицин-С.

Рак мочевого пузыря (РМП) в структуре онкологических заболеваний (в 2006 г. в России выявлено 12700 больных) составляет 4%, поражая мужчин и женщин в соотношении 3:1. Наиболее часто (70–80%) встречаются неинвазивные опухоли мочевого пузыря, распространяющиеся в пределах слизистого и подслизистого слоев. Однако поверхностный РМП склонен к рецидивированию, причем у половины больных рецидивы возникают в течение первого года после проведенного хирургического вмешательства.

Прогноз болезни зависит от стадии и дифференцировки опухоли. Возникновение рецидива или прогрессирования заболевания зависит от ряда прогностических факторов: размер опухоли, ее дифференцировка, количества опухолей (единичные или множественные), частота возникновения рецидивов за год [1].

Основными методами профилактики рецидивов, прогрессирования и при определенных показаниях лечения поверхностного РМП являются внутривезикулярная химиотерапия (ВХТ), внутривезикулярная иммунотерапия и фотодинамическая терапия [2]. Идеальный препарат для химиотерапии рака должен сочетать два основных качества: высокую противоопухолевую активность и низкую системную токсичность. Внутривезикулярное введение химиопрепарата позволяет, с одной стороны, снизить системное токсическое воздействие, а с другой – доставить химиопрепарат к опухоли в максимальной концентрации.

В настоящее время препаратом первой линии при поверхностном раке мочевого пузыря является

Митомицин-С (6-Амино-1,1а,2,8,8а,8б-гексагидро-8-(гидроксиметил)-8а-метокси-5-метил-азирино[2',3':3,4] пирроло[1,2-а]индол-4,7-дион карбамат) – антибиотик, образуемый некоторыми видами актиномицетов (рис. 1). Он ингибирует синтез и повреждает ДНК в клетках, а также способствует перекисному окислению липидной мембраны. Препарат не имеет стандартной дозы для внутривезикулярного введения, доза может варьировать от 20 до 60 мг на введение с экспозицией до 180 мин. Суммарная курсовая доза препарата варьирует от 150 до 300 мг [3]. Однако, по данным работы [4], в группе больных, получивших однократную инстилляцию химиопрепаратом, частота рецидивов составила 35,8% у больных с одиночными опухолями, а у пациентов с мультифокальным поражением мочевого пузыря частота рецидивов достигала 65,2%. Данный факт свидетельствует о том, что однократная инстилляционная является недостаточно эффективной профилактической процедурой у боль-

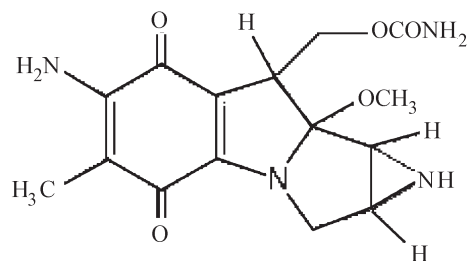


Рис. 1. Структурная формула митомицина-С

\*Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена.

ных с множественными опухолями. Высокий процент рецидивов при внутривузырной химиотерапии митомицином-С заставляет искать повышения эффективности внутривузырной химиотерапии в плоскости ее комбинированного использования с другими противоопухолевыми методами, в частности с фотодинамической терапией.

При этом необходим контроль за количеством препарата, собирающегося на стенках мочевого пузыря в здоровых и пораженных раком участках. В литературе, однако, встречаются лишь способы определения митомицина-С в плазме крови. В работе [5] к аликвоте плазмы добавляли раствор внутреннего стандарта (порфирамицина), смесь перемешивали в течение 10 мин, добавляли ацетонитрил для денатурации белка, центрифугировали полученную смесь и в течение 4–5 ч испаряли растворитель под вакуумом. В процессе определения использовали колонку Hypersyl-ODS-C18 (250×8,4 мм, 5 мкм). Предел обнаружения составил 0,5 мкг/л.

В работе [6] для определения митомицина-С в плазме крови использовали колонку LiChroCART C18 (250×4 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали ацетатный буферный раствор и ацетонитрил в соотношении 85:15, скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин, спектрофотометрическое детектирование проводили при 365 нм. Предел обнаружения составил 0,45 мкг/л.

В табл. 1 приведены важнейшие характеристики рассмотренных выше методов определения митомицина-С. По-видимому, хроматографическое определение более предпочтительно, так как обладает большей селективностью по сравнению с электрохимическим. При выборе детектора при хроматографическом определении митомицина-С важно отметить, что спектрофотометрическое детектирование дает более высокие пределы обнаружения, к тому же обладает меньшей селективностью, чем масс-спектрометрическое. Таким образом, для проведения эксперимента было выбрано хроматографическое определение с масс-селективным детектированием.

Данная статья посвящена разработке способа хромато-масс-спектрометрического определения митомицина-С в тканях мочевого пузыря.

### Экспериментальная часть

Хроматографические эксперименты выполняли на приборном комплексе «Agilent 1100» фирмы «Agilent» (США), включающем бинарный градиентный насос, автосэмплер, термостат колонки, квадрупольный масс-спектрометрический детектор серии SL,

снабженный источником электрораспылительной ионизации и компьютерную систему для сбора и обработки данных. Разделение проводили на хроматографической колонке Zorbax Eclipse XDB-C18 (150×4,6 мм, размер зерна 5 мкм, «Agilent Technologies», США). Пробы взвешивали на аналитических весах «OHAUS Explorer Pro», США с точностью 0,0001 г. Для гомогенизации проб использовали гомогенизатор «SilentCrusher», снабженный насадкой типа 3F фирмы «Heidolph», Германия и ультразвуковую баню («Canfup», Россия). Перед вводом в хроматограф пробы центрифугировали на центрифуге «Elmi CM-50» (Латвия) при скорости вращения 18000 об./мин. Для отбора точных объемов жидкостей использовали дозаторы переменного объема 10–100 и 100–1000 мкл, фирмы «HTL», Польша. Для приготовления растворов известной концентрации использовали Митомицин-С фирмы «Sigma-Aldrich» (США), а также ацетонитрил (HPLC, gradient grade, «Panreac», Испания). Растворы готовили на деионизованной воде сопротивлением не менее 18,2 Мом.

Для градуировки использовали образец ткани, не содержащей митомицин-С. Образец массой около 50 мг гомогенизировали с 0,5 мл физиологического раствора, в гомогенат вносили необходимое количество стандартного раствора митомицина-С (табл. 1) и добавляли деионизованную воду в таком количестве, чтобы суммарный объем жидкости (физиологического раствора, стандартного раствора митомицина-С и воды) был равен 1 мл. Далее гомогенат помещали на 5 мин на ультразвуковую баню (температура бани не должна превышать 20°C). Смесь центрифугировали в течение 1 мин, отбирали надосадочную жидкость и вводили в хроматограф.

В исследовании принимали участие 5 пациентов (мужчины) с первичными и рецидивирующими опухолями мочевого пузыря. Средний возраст составил 64 года. У трех пациентов был диагностирован высокодифференцированный переходноклеточный рак (G1), у двух – низкодифференцированный переходноклеточный рак (G3) (табл. 2). После проведения каждого лечебного сеанса проводили биопсию неизменной слизистой оболочки и опухоли. Биоптаты помещали в пластиковую пробирку, содержащую 1 мл физиологического раствора и определяли концентрацию митомицина-С методом ВЭЖХ. Накопление митомицина-С в слизистой и опухоли исследовали в двух разных режимах: 1) внутривузырное введение митомицина-С в дозе 40 мг с экспозицией 2 ч; 2) внутривузырное введение митомицина-С в дозе 40 мг с экспозицией 2 ч и с последующей обработкой

Сравнительная характеристика разных методов определения митомицина-С

Метод определения	Условия определения	Детектирование	Предел обнаружения	Диапазон линейности градуировочного графика	Литература
Хроматографический	подвижная фаза H <sub>2</sub> O:MeCN (78:22); скорость потока 0,6 мл/мин; температура 35°C; объем пробы 70 мкл	масс-селективное (ESI, напряжение фрагментора 200 В)	20 нг/л	0,1–250 мкг/л	[7]
Хроматографический	подвижная фаза H <sub>2</sub> O:MeCN (70:30); скорость потока 1,3 мл/мин; температура 30°C; объем пробы 50 мкл	спектрофотометрическое (длина волны детектирования 365 нм)	1 мкг/л	1–500 мкг/л	[5]
Хроматографический	подвижная фаза – фосфатный буферный раствор и метанол (85:15); скорость потока 1 мл/мин; температура колонки 30°C; объем пробы 200 мкл	спектрофотометрическое (длина волны детектирования 365 нм)	500 нг/л	0,5–50 мкг/л	[8]
Хроматографический	подвижная фаза – ацетатный буферный раствор и MeCN (85:15); скорость потока 1 мл/мин; температура колонки 30°C; объем пробы 200 мкл	спектрофотометрическое (длина волны детектирования 365 нм)	450 нг/мл	40 до 1000 мкг/л	[6]
Электрохимический	первоначальный потенциал 0,0 В; конечный потенциал 0,75 В; скорость развертки 0,2 В/с	–	30 мкг/л	100–1000 мг/л	[9]
Электрохимический	первоначальный потенциал 0,0 В; конечный потенциал 0,75 В; скорость развертки 0,2 В/с	–	27 мкг/л	83,5 мкг/л – 0,033 г/л	[10]

уротеля лазером с длиной волны 630 нм и плотностью энергии 12 Дж/см<sup>2</sup>.

До проведения исследования с помощью диагностической установки «Спектр» установлено, что раствор митомицина-С не меняет длину волны и плотность энергии лазерного излучения. В исследовании использовали полупроводниковый лазер с длиной волны 630 нм.

### Результаты и их обсуждение Выбор условий хроматографического определения

В качестве подвижной фазы выбраны смеси воды и ацетонитрила в разных соотношениях, так как обычно при использовании таких смесей удается добиться наибольшей эффективности и симметричности хроматографического пика. На рис. 2 представлена за-

Т а б л и ц а 2

Содержание митомицина-С в образцах ткани ( $n = 5, P = 0,95$ )

Возраст (лет), тип опухоли	Место отбора пробы	Найденная концентрация митомицина-С после обработки, мкг/г ткани	
		митомицин-С	митомицин-С и лазер 12 Дж/см <sup>2</sup>
58, G1	слизистая	188± 22	11± 2
	опухоль	40± 3	123± 17
63, G3	слизистая	345± 37	161± 18
	опухоль	147± 21	359± 38
66, G1	слизистая	272± 23	77± 8
	опухоль	181± 21	130± 19
67, G1	слизистая	133 ± 20	4,1 ± 0,6
	опухоль	95 ± 14	128 ± 19
68, G3	слизистая	60± 9	202± 26
	опухоль	198± 24	453± 42

висимость времени удерживания митомицина-С от содержания ацетонитрила в подвижной фазе. Увеличение доли ацетонитрила ведет к уменьшению времени удерживания митомицина-С. При определении митомицина-С в реальных образцах использовали режим градиентного элюирования. Состав подвижной фазы в данном случае изменяли следующим образом: в начальный момент времени элюент состоял на 70% из воды и на 30% из ацетонитрила, затем после элюирования митомицина-С из хроматографической колонки (через 5 мин после начала анализа) долю ацетонитрила в подвижной фазе повышали до 90% с целью быстрого вымывания сильноудерживаемых

компонентов пробы, после чего (через 7,5 мин после начала анализа) состав элюента приводили к первоначальному состоянию (вода 70%, ацетонитрил 30%). Таким образом, удавалось сократить время анализа до 12 мин без ущерба для селективности разделения. Хроматографическую колонку термостатировали при 30°С. Объем вводимой пробы составлял 50 мкл, а скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин.

**Выбор режима детектирования**

В качестве источника ионизации выбран вариант электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов. Для подбора оптимальных условий масс-спектроскопического детектирования в режиме прямого ввода использовали раствор митомицина (50 мкг/л) в режиме сканирования ионов (от  $m/z = 100$  до  $m/z = 1000$ ). Найдено, что наиболее интенсивными ионами в масс-спектре являлись ионы с  $m/z = 335$  и  $m/z = 357$  (рис. 3). Для снижения пределов обнаружения количественное определение проводили по сумме аналитических сигналов, полученных от этих ионов.

Для поиска наилучшего соотношения сигнал/шум исследовали зависимость сигналов от напряжения фрагментора. Напряжение варьировали в диапазоне от 0 до 200 В с шагом 10 В (рис. 4). Установлено, что оптимальное значение напряжения фрагментора составляет 40 В.

**Пробоподготовка**

Объектами исследования являлись образцы ткани мочевого пузыря, взятые на опухоли и вблизи опу-

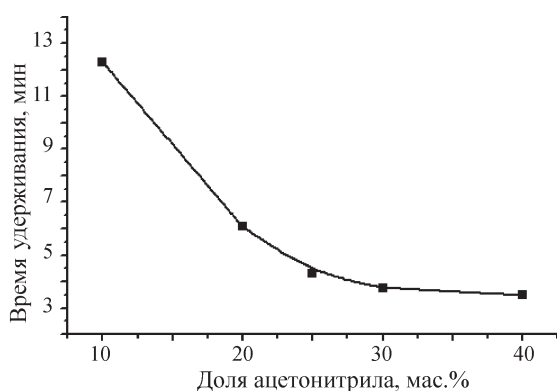


Рис. 2. Зависимость времени удерживания митомицина-С от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Условия определения: колонка Zorbax Eclipse XDB-C18 (150×4,6 мм, размер зерна 5 мкм). Градиентное элюирование при соотношении воды и ацетонитрила: 0–5 мин вода (70:30); 5,0–7,5 мин (10:90); 7,5–12,0 мин (70:30). Термостатирование при 30 °С. Объем вводимой пробы 50 мкл, скорость потока подвижной фазы 0,5 мл/мин. Спектрофотометрическое детектирование при 365 нм

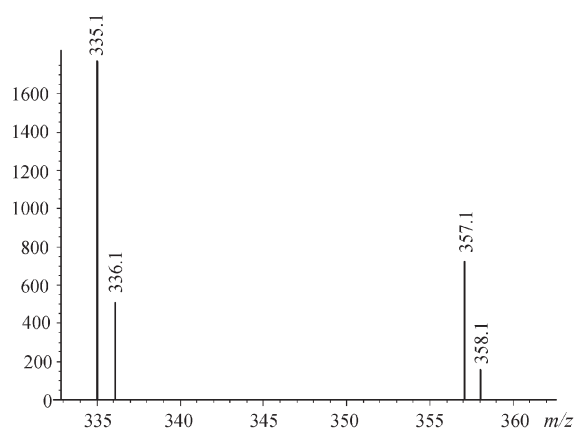


Рис. 3. Масс-спектр митомицина-С

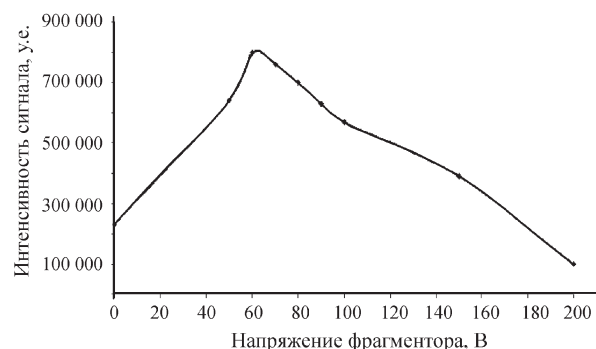


Рис. 4. Зависимость интенсивности сигнала детектора при разных напряжениях фрагментора

холи. Определение митомицина-С проводили в два этапа. На первом этапе отбирали физиологический

раствор, в котором находился образец ткани. Измеряли объем отобранной жидкости и вводили в хроматограф. Второй этап – определение содержания митомицина-С непосредственно в ткани. Для этого пробирку с тканью взвешивали на аналитических весах, затем добавляли 0,5 мл экстрагента и помещали на 2 мин на ультразвуковую баню. Обнаружено, что наилучшим экстрагентом является вода, так как при ее использовании удается добиться наиболее полной экстракции из-за наибольшего разбухания образца ткани. Ультразвуковую баню использовали для интенсификации процесса экстракции, т.е. для сокращения времени пробоподготовки и увеличения степени извлечения митомицина-С из ткани. Температуру воды в бане поддерживали на уровне 40°C во избежание разложения митомицина-С. Далее полученный раствор с осадком центрифугировали (16 000 об/мин) в течение 2 мин и отобранную надосадочную жидкость вводили в хроматограф. После этого содержимое пробирки удаляли, выдерживали пустую пробирку в течение 2 ч в сушильном шкафу при температуре 150°C и взвешивали пустую пробирку на аналитических весах. Массу ткани находили по разности полученных величин. Затем суммировали значения концентрации митомицина-С, полученные на первом и втором этапах, и пересчитывали содержание данного вещества на 1 г ткани.

#### *Количественное определение митомицина-С*

В оптимальных условиях была построена градуировочная зависимость площади пика от концентрации митомицина-С. Для построения зависимости исполь-

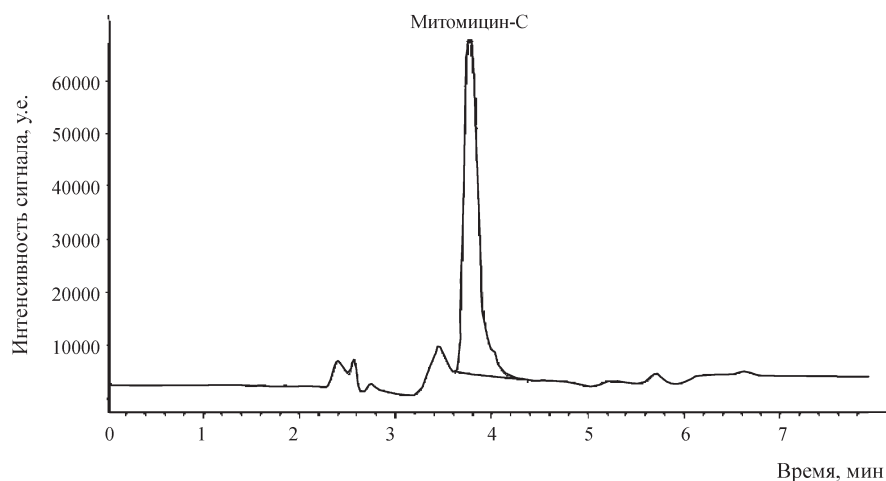


Рис. 5. Хроматограмма экстракта ткани здорового участка ткани мочевого пузыря, обработанного митомицином-С. Условия определения см. на рис. 2

зовали экстракты из контрольного (т.е. не содержащего митомидин-С) образца ткани, добавляя известные количества митомидин-С. Градуировочный график линейен при концентрациях от 20 до 400 мкг/л. Предел обнаружения составил 15 нг/л. На рис. 5 представлена хроматограмма экстракта здорового участка ткани мочевого пузыря, обработанного митомидином-С.

В табл. 2 приведено содержание митомидин-С в образцах, взятых на разных участках ткани больных раком мочевого пузыря. Хотя для достоверных выводов число пациентов недостаточно, вероятно, можно говорить о тенденции накопления митомидин-С в тканях опухоли после ее обработки лазером.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Botteman M.F., Pashos C.L., Hauser R.S.* // Qual. Life. Res. 2003. **12**. P. 675.
2. *Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В.* Злокачественные новообразования в России в 2001 году (заболеваемость и смертность). М., 2010.
3. *Русаков И.Г., Быстров А.А.* // Практ. онкология. 2003. **4**. С. 214.
4. *Hamdy F.C., Hastie K.J., Kerry R., Williams J.L.* // Braz. J. Urol. 1993. **71**. P. 183.
5. *Rump A., Woschee M., Theisoehn R., Fischbach W., Lackner W., Klaus W.* // Eur J. Clin. Pharmacol. 2002. **58**. P. 459.
6. *Yi D., Yi J., Xue D., Xue B.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2005. **25**. P. 413.
7. *Nozal M.J., Bernal J.L., Marin M.T., Bernal J., Torres R.M., Merayob J.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2006. **40**. P. 100.
8. *Paroni R., Arcelloni C., Vecchi D.* // Clin-Chem. 1997. **43**. P. 615.
9. *Marin D., Pérez P., Teijeiro C., Palecek E.* // Biological Procedures Online. 1998. **1**. P. 100.
10. *Qu W., Wang H., Wu K.* // Collect. Czech. Chem. Commun. 2005. **70**. P. 178.

Поступила в редакцию 06.04.12

## THE DETERMINATION OF MITOMYCIN-C IN URINARY BLADDER AT SURFACE CANCER THERAPY

A.V. Pirogov, E.B. Pashkova, A.A. Bendryshev, R.V. Ulyanov, O.A. Shpigun

**A technique of the quantitative determination of mitomycin-C in bladder core by a method of gradient high performance liquid chromatography with a mass-spectrometric detection in an electrospray mode of ionization was developed. A range of linearity of the calibration plot is 20 to 400 ppb. The limit of the detection is 15 ppb. A sampling procedure, including a single extraction by water allow the quantitatively determination of mitomycin-C. The proposed technique was used for the determination of mitomycin-C in the real samples of human bladder.**

**Key words:** *microemulsion liquid chromatography, mitomycin-C.*

**Сведения об авторах:** *Пирогов Андрей Владимирович* – вед. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (Pirogov@analyt.chem.msu.ru); *Пашкова Елена Борисовна* – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ; *Бендрыйшев Александр Александрович* – мл. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ; *Ульянов Роман Васильевич* – науч. сотр. Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена, канд. мед. наук; *Шпигун Олег Алексеевич* – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук, чл.-корр. РАН (Shpigun@analyt.chem.msu.ru).

Уточните шкалу оси ординат на рис. 5 (в оригинале ничего не видно).