

Международный научно-практический журнал

ЕВРАЗИЙСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

onco.recipe.by

2017, том 5, № 3

Россия

Учредители:

Ассоциация директоров центров и институтов онкологии и рентгенодиагностики стран СНГ и Евразии, УП «Профессиональные издания», ООО «Вилин»

Журнал зарегистрирован

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) 18 сентября 2014 г.
Свидетельство ПИ № ФС77-59215

Представитель в России:

ООО «Вилин»
214006, Смоленск, пст Пасово.
Тел./факс: +7 920 301 00 19;
e-mail: office@recipe.by

Беларусь

Учредители:

УП «Профессиональные издания»

Журнал зарегистрирован

Министерством информации Республики Беларусь
Регистрационное свидетельство № 1659
от 30 августа 2013 г.

Адрес редакции:

220049, Минск, ул. Кнорина, 17.
Тел.: (017) 322 16 76, (017) 322 16 77;
e-mail: onco@recipe.by

Директор

Евтушенко Л.А.
Руководитель службы рекламы и маркетинга Коваль М.А.
Технический редактор Нужин Д.В.

Украина

Учредитель:

Национальный институт рака
Министерства здравоохранения Украины,
УП «Профессиональные издания»

Журнал зарегистрирован

Государственной регистрационной службой Украины 28 ноября 2014 г.
Свидетельство КВ № 21182-10982Р

Офис в Украине:

ООО «Профессиональные издания»
Украина
04116, Киев, ул. Старокиевская, 10-г, сектор «В», офис 201

Контакты:

Тел.: +38 (044) 33 88 704, +38 (094) 910 17 04
e-mail: reklama_id@ukr.net

Подписка

в каталоге РУП «Белпочта» (Беларусь) индивидуальный индекс 00083; ведомственный индекс 000832, в каталоге АО «Казпочта» (Казахстан) индекс 00083.

В Украине подписка оформляется через офис ООО «Издательский дом "Профессиональные издания"».

00083 – единый индекс в электронных каталогах «Газеты и журналы» на сайтах агентств:

ООО «Информнаука» (Российская Федерация), ЗАО «МК-Периодика» (Российская Федерация), ГП «Пресса» (Украина), ГП «Пошта Молдовей» (Молдова), АО «Летувос паштас» (Литва), ООО «Подписное агентство PKS» (Латвия), Фирма «INDEX» (Болгария), Kubon&Sagner (Германия).

Электронная версия журнала доступна на сайте onco.recipe.by, в Научной электронной библиотеке eLibrary.ru, в базе данных East View, в электронной библиотечной системе IPRbooks.

По вопросам приобретения журнала обращайтесь в редакцию в Минске и к представителю издательства в Киеве.

Журнал выходит 1 раз в 3 месяца.

Цена свободная.

Подписано в печать: 25.10.2017.

Тираж (Беларусь) 500 экз.

Тираж (Украина) 1500 экз.

Тираж (Россия) 3500 экз.

Заказ №

Формат 70x100 1/16. Печать офсетная

Отпечатано в типографии

ФЛП Нестерова Л.О.

тел. +3 8068 22 62 444

© «Евразийский онкологический журнал»

Авторские права защищены. Любое воспроизведение материалов издания возможно только с письменного разрешения редакции с обязательной ссылкой на источник.

© УП «Профессиональные издания», 2017

© Оформление и дизайн УП «Профессиональные издания», 2017

Главный редактор

Давыдов М.И. (Россия, Москва)

Заместители главного редактора

Глушук В.А. (Беларусь, Минск)
Залуцкий И.В. (Беларусь, Минск)
Чойнзонов Е.Ц. (Россия, Томск)

Координатор проекта

Демидов Л.В. (Россия, Москва)

Редакционный совет

Алиев Д.А. (Азербайджан, Баку)
Беляев А.М. (Россия, Санкт-Петербург)
Бейшембаев М.И. (Кыргызстан, Бишкек)
Бердымурадова М.Б. (Туркменистан, Ашхабад)
Галстян А.М. (Армения, Ереван)
Гранов А.М. (Россия, Санкт-Петербург)
Кайдарова Д.Р. (Казахстан, Алматы)
Каприн А.Д. (Россия, Москва)
Кит О.И. (Россия, Ростов-на-Дону)
Колесник Е.А. (Украина, Киев)
Красносельский Н.В. (Украина, Харьков)
Лазарев А.Ф. (Россия, Барнаул)
Наврұзов С.Н. (Узбекистан, Ташкент)
Нургазиев К.Ш. (Казахстан, Алматы)
Солодкий В.А. (Россия, Москва)
Суконко О.Г. (Беларусь, Минск)
Хасанов Р.Ш. (Россия, Казань)
Хусейнов З.Х. (Таджикистан, Душанбе)
Чернат В.Ф. (Молдова, Кишинев)
Чехун В.Ф. (Украина, Киев)

НАЦИОНАЛЬНЫЕ РЕДАКЦИОННЫЕ КОЛЛЕГИИ**КАЗАХСТАН**

Казахский научно-исследовательский институт онкологии и радиологии
Адилбай Д.Г.
Гончарова Т.Г.
Жолдыбай Ж.Ж.
Ижанов Е.Б.
Чингисова Ж.К.
Шатковская О.В.

КЫРГЫЗСТАН

Национальный центр онкологии Министерства здравоохранения Кыргызской Республики
Абдылдаев Т.А.
Айдарбекова А.А.
Аралбаев Р.Т.
Токтомушев А.Т.
Шаимбетов Б.О.

МОЛДОВА

Институт онкологии Республики Молдова
Булат Ю.В.
Донская А.Е.
Мереуце И.Е.
Цыбырнэ Г.А.

РОССИЯ

Республиканский клинический онкологический диспансер Министерства здравоохранения Республики Татарстан (Казань)
Бурмистров М.В.
Зинченко С.В.
Пушнов А.В.
Федоров И.В.

ТАДЖИКИСТАН

Онкологический центр Министерства здравоохранения Республики Таджикистан
Закирходжаев Д.З.
Расулов С.Р.
Умарова С.Г.
Хабидуллаев Ш.З.
Хусейнов З.Х.
Юлдашев Р.З.

ТУРКМЕНИСТАН

Научно-клинический центр онкологии Министерства здравоохранения и медицинской промышленности Туркменистана
Аннамухаммедов А.А.
Бабаев К.А.
Бяшимов А.Я.
Джумаев М.Г.
Хуммедов О.М.
Якшимурадов А.А.

УЗБЕКИСТАН

Республиканский онкологический научный центр Министерства здравоохранения Республики Узбекистан
Абдихакимов А.Н.
Абдужаппаров С.Б.
Алимходжаева Л.Т.
Гафур-Ахунов М.А.
Джураев М.Д.
Пулатов Д.А.
Тилляшайхов М.Н.
Юсупбеков А.А.

УКРАИНА

Национальный институт рака (Киев)
Иванкова В.С.
Киркилевский С.И.
Крячок И.А.
Процик В.С.
Сивак Л.А.
Смоланка И.И.
Солодяникова О.И.
Стаховский Э.А.

Рецензируемое издание

Входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований (приказ №16 от 21.01.2015).

Научные статьи, опубликованные в журнале, для украинских соискателей ученых степеней на основании приказа МОНмолодьспорта Украины от 17.10.2012 № 1112 приравниваются к зарубежным публикациям.

Ответственность за точность приведенных фактов, цитат, собственных имен и прочих сведений, а также за разглашение закрытой информации несут авторы.

Редакция может публиковать статьи в порядке обсуждения, не разделяя точки зрения автора

International scientific journal
**EURASIAN
JOURNAL
OF ONCOLOGY**
Evrazijskij Onkologicheskij zhurnal

www.recipe.by

2017, volume 5, № 3

Russia

Founders:

Association of Directors of Centers and Institutes of Oncology and Radiology of the CIS and Eurasia, UE "Professional Editions", LLC "Vilin"

The journal is registered

Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor) September 18, 2014 Certificate PI number FS77-59215

Representative in Russia:

LLC "Vilin"
214006, Smolensk, Pasovo.
Phone/fax: +7 920 301 00 19;
e-mail: office@recipe.by

Belarus

Founder:

UE "Professional Editions"

The journal is registered

in the Ministry of information of the Republic of Belarus Registration certificate № 1659 August 30, 2013

Address of the editorial office:

220049, Minsk, Knorin str., 17.
Phone: +375 (017) 322 16 76, (017) 322 16 77;
e-mail: onco@recipe.by

Director Evtushenko L.

Head of advertising and marketing Koval M.

Technical editor Nuzhyn D.

Ukraine

Founders:

National Cancer Institute of the Ministry of Health of Ukraine, UE "Professional Editions"

The journal is registered

at State Registration Service of Ukraine November 28, 2014 Certificate HF №21182-10982R

Office in Ukraine:

LLC "Professional Editions. Ukraine"

Contacts:

phone: +38 (044) 33 88 704,
+38 (094) 910 17 04,
e-mail: reklama_id@ukr.net

Subscription:

in the Republican unitary enterprise «Belposhta» individual index – 00083; departmental index – 000832, in JSC "Kazpochta" catalogue (Kazakhstan) index 00083.

In Ukraine the subscription is made out through office LLC "Publishing house «Professional Edition»".

Index **00083** in the electronic catalogs "Newspapers and Magazines" on web-sites of agencies:

LLC "Interpochta-2003" (Russian Federation); LLC "Informnauka" (Russian Federation); JSC "MK-Periodika" (Russian Federation); SE "Press" (Ukraine); SE "Poshta Moldovey" (Moldova); JSC "Letuvos pashtas" (Lithuania); LLC "Subscription Agency PKS" (Latvia); "INDEX" Firm agency (Bulgaria); Kubon&Sagner (Germany).

The electronic version of the journal is available on onco.recipe.by, on the Scientific electronic library elibrary.ru, in the East View database, in the electronic library system IPRbooks.

Concerning acquisition of the journal address to the editorial office in Minsk and to a representative of publishing house in Kyiv.

The frequency of journal is 1 time in 3 months.

The price is not fixed.

Sent for the press 25.10.2017.

Circulation is 500 copies (Belarus).

Circulation is 1500 copies (Ukraine).

Circulation is 3500 copies (Russia).

Order №

Format 70x100 1/16. Litho

Printed in printing house

FLP Nesterova L.O.
Phone: +380682262444.

© "Eurasian Journal of Oncology"

Copyright is protected. Any reproduction of materials of the edition is possible only with written permission of edition with an obligatory reference to the source.

© "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2017

© Design and decor of "Professional Editions" Unitary Enterprise, 2017

Editor In Chief

Davydov M. (Russia, Moscow)

Deputy Editor in Chief

Choinzonov Ye. (Russia, Tomsk)
 Glushuk V. (Belarus, Minsk)
 Zalutskiy I. (Belarus, Minsk)

Project Coordinator

Demidov L. (Russia, Moscow)

Editorial Board

Aliev Dz. (Azerbaijan, Baku)
 Beljaev A. (Russia, Saint-Petersburg)
 Bejshembaev M. (Kyrgyzstan, Bishkek)
 Berdymuradova M. (Turkmenistan, Ashgabat)
 Chehun V. (Ukraine, Kyiv)
 Chernat V. (Moldova, Chisinau)
 Galstjan A. (Armenia, Yerevan)
 Granov A. (Russia, Saint-Petersburg)
 Hasanov R. (Russia, Kazan)
 Husejnov Z. (Tadzikistan, Dushanbe)
 Kaidarova D. (Kazakhstan, Almaty)
 Kaprin A. (Russia, Moscow)
 Kit O. (Russia, Rostov-on-Don)
 Kolesnik E. (Ukraine, Kyiv)
 Krasnoselskij N. (Ukraine, Kharkov)
 Lazarev A. (Russia, Barnaul)
 Navruzov S. (Uzbekistan, Tashkent)
 Nurgaziev K. (Kazakhstan, Almaty)
 Solodkij V. (Russia, Moscow)
 Sukonko O. (Belarus, Minsk)

NATIONAL EDITORIAL BOARDS**KAZAKHSTAN**

Kazakh research Institute of Oncology and radiology

Adilbai D.
 Chingisova J.
 Goncharova T.
 Izhanov E.
 Shatkovskaya O.
 Zholdybai J.

KYRGYZSTAN

National Cancer Center of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic

Abdyldaev T.
 Aydarbekova A.
 Aralbaev R.
 Shaimbetov B.
 Toktomushev A.

MOLDOVA

Oncology Institute of the Republic of Moldova

Bulat Yu.
 Donskaja A.
 Mereuce I.
 Tsybyrne G.

RUSSIA

Regional Clinical Oncology Center of the Ministry of Health of the Republic of Tatarstan (Kazan)

Burmistrov M.
 Fedorov I.
 Pushnov A.
 Zinchenko S.

TADZIKISTAN

Cancer Center of the Ministry of Health of the Republic of Tadzikistan

Habibullayev S.
 Rasulov S.
 Umarov S.
 Yuldashev R.
 Zakiryahodzhaev Z.

TURKMENISTAN

Research and Clinical Oncology Center of the Ministry of Health and Medical Industry of Turkmenistan

Annamuhammedov A.
 Babajev K.
 Byashimov A.
 Dzhumajev M.
 Hummedov O.
 Yakshimuradov A.

UZBEKISTAN

National Cancer Research Center of the Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan

Abdihakimov A.
 Abduzhapparov S.
 Alimhodzhaeva L.
 Djuraev M.
 Ghafoor-Ahunov M.
 Pulatov D.
 Tillyashayhov M.
 Yusupbekov A.

UKRAINE

The National Cancer Institute (Kyiv)

Ivankova V.
 Kirkilevskij S.
 Kryachok I.
 Protsyk V.
 Sivak L.
 Smolanka I.
 Solodyannikova O.
 Stakhovskiy E.

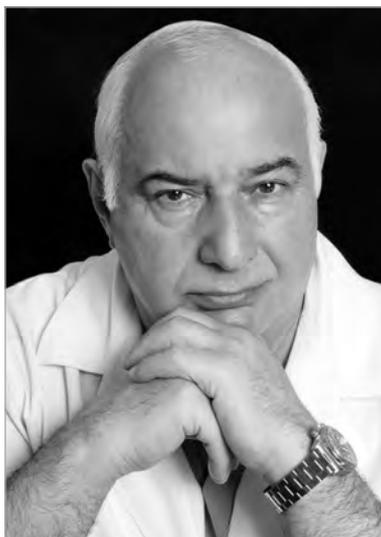
Peer-reviewed edition

The journal is included into a List of scientific publications of the Republic of Belarus for the publication of the results of the dissertation research (protocol No. 16 of 21.01.2015).

Scientific articles published in the journal for Ukrainian applicants of academic degrees on the basis of the order of Ministry of Education and Science, Youth and Sports of Ukraine from 17.10.2012 № 1112 are equated to foreign publications.

Responsibility for the accuracy of the given facts, quotes, own names and other data, and also for disclosure of the classified information authors bear.

Editorial staff can publish articles as discussion, without sharing the point of view of the author



Уважаемые коллеги, дорогие друзья!

Размышляя над очередным обращением к читательской аудитории «Евразийского онкологического журнала», я хотел бы коснуться темы новейших технологий, активно внедряемых в лечение онкологических заболеваний и скрининговые исследования.

Ранняя диагностика – это своего рода стратегия, которая может обеспечивать не только своевременное выявление различных форм рака, но и высокий процент выживаемости пациентов. Для этого мало понимать стратегию, нужно четко владеть тактикой на местах: внедрять инновационное оборудование и умело его использовать. К слову, на сегодняшний день мы можем гордиться целым рядом научных открытий отечественных разработчиков. Я бы сказал, что мы наблюдаем сокращение в разрыве между западноевропейскими, американскими и российскими технологическими изысканиями. Это, безусловно, вселяет определенный оптимизм, однако российским специалистам, равно как и их коллегам из других постсоветских стран, предстоит большая работа: самый современный аппарат в неумелых руках всего лишь груда железа. Нам необходимо научиться в совершенстве работать на современном оборудовании. Время меняется, и мы должны быстро перестраиваться, брать на вооружение последние достижения науки.

Скрининговые исследования, внедрение которых позволит говорить о сокращении смертности на 30%, – это важнейшая задача, решение которой может приблизить наши статистические показатели в онкоэпидемиологии к показателям западноевропейских стран.

О своем опыте, новых технологиях и методах лечения, дорогие коллеги, предлагаю делиться на страницах журнала.

Михаил Давыдов,
главный редактор



СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные исследования

Отдаленные результаты гормоно-лучевой терапии рака предстательной железы промежуточного и высокого риска
Исаев И.Г., Гулиев Ф.А., Акперов К.С., Везирова З.Ш.367

Анализ 108 клинических исходов саркомы Юинга у детей Республики Беларусь за 15-летний период наблюдения
Киселёв Л.П., Алейникова О.В.373

Маркеры ангиогенеза и антиангиогенная терапия у пациентов с локализованными формами саркомы Юинга
Киселёв Л.П., Савицкая Т.В., Алейникова О.В.383

Сравнительный анализ клиничко-морфологических и молекулярно-биологических особенностей рака молочной железы у женщин разных возрастных периодов
Грибач С.М., Чехун В.Ф., Полищук Л.З.393

Закономерности экспрессии тканевой транскляминазы в колоректальном раке
Рукша К.Г., Жерко И.Ю., Неровня А.М., Бич Т.А., Тур Г.Е., Горгун Ю.В., Портянко А.С.404

Экспрессия генетических маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и маркера стволовой клетки в циркулирующих опухолевых клетках при первичном метастатическом раке молочной железы
Шляхтунов Е.А., Веремей И.С.412

Современная лучевая терапия в лечении пациентов со злокачественными новообразованиями верхних дыхательных путей
Иванкова В.С., Скоморохова Т.В., Столярова О.Ю., Галяс О.В.420

Исход аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с острым лейкозом

в зависимости от уровня химеризма на 30-й день
Лавриненко В.А., Марейко Ю.Е., Красько О.В., Березовская Е.Ю., Доронина С.Н., Стёганцева М.В., Савицкая Т.В., Минаковская Н.В., Белевцев М.В., Алейникова О.В.429

Метод количественного определения кольцевых молекул ДНК T- и B-клеточного рецептора, TREC и KREC, в периферической крови с использованием ПЦР в реальном времени
Стёганцева М.В., Гурьянова И.Е., Сакович И.С., Полякова Е.А., Белевцев М.В.449

Обзоры. Лекции

Гипоксия и прогрессирование рака желудка
Антонов Е.А.457

Некоторые аспекты применения костных ксеногенных и других трансплантатов при реконструктивно-восстановительных этапах операций по удалению опухолей костей скелета (обзор литературы)
Базаров Н.И., Касымов М.М., Аминов П.О., Рахимов Н.М., Нарзулоев В.А.465

Применение лекарственных средств

Опыт применения препарата Алмиба в паллиативной терапии у онкологических пациентов отделения хоспис
Чернякова Л.К., Слободская Н.С.473

Врачебная практика

Редкий случай первичной злокачественной фиброзной гистиоцитомы почки
Молошок А.А., Ерко И.П., Рудич Ю.В., Шеремок Л.В.476

Молекулярно-генетические методы ранней диагностики рака желудка у пациентов с хроническим атрофическим гастритом
Джураев М.Д., Юсупбеков А.А., Абдужаппаров С.Б., Турдикулова Ш.У., Долимова Д., Кодиров Х.Х., Абдурахмонов Б.Б.479

CONTENT

Original research

Delayed results of hormonal and radiotherapy for intermediate and high risk prostate carcinoma

Isayev I., Guliyev F., Akperov K., Vesirova Z. 367

Ewing's sarcoma in Belarus Republic: 15-year survival rate and clinical features of 108 pediatric patients

Kisialeu L., Aleinikova O. 373

Angiogenesis markers and antiangiogenic therapy for patients with localized Ewing's sarcoma

Kisialeu L., Savitskaia T., Aleinikova O. 383

Comparative analysis of clinical, morphological and molecular biological features of breast cancer in women of different age periods

Grubac S., Chekhun V., Polishchuk L. 393

Expression of tissue transglutaminase in colorectal cancer

Ruksha K., Zherko I., Nerovnya A., Bich T., Tur G., Gorgun J., Portyanko A. 404

Expression of genetic markers of epithelium-mesenchymal transition and stem cell marker in circulating tumor cells in primary nonmetastatic breast cancer

Shlyakhtunou Y., Veremeyi I. 412

Modern radiotherapy of treatment malignancies upper respiratory tract

Ivankova V., Skomorokhova T., Stolarova O., Halyas O. 420

Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on chimerism level on day-30

Lavrinenko V., Marejko Yu., Krasko O., Berezovskaya E., Doronina S., Stegantseva M., Savitskaya T., Minakovskaya N., Belevtsev M., Aleinikova O. 429

Method of quantitative assay of circular molecules of T- and B-cell receptor, TREC and KREC, in peripheral blood by real-time PCR

Stegantseva M., Guryanova I., Sakovich I., Polyakova E., Belevtsev M. 449

Reviews. Lectures

Hypoxia and progression of gastric cancer

Antonov E. 457

Some aspects of the use of xenogenic bone and other transplants in reconstructive phases of operations to remove bone tumors of the skeleton (literature review)

Bazarov N., Kasymov M., Aminov P., Rakhimov N., Narzuloev V. 465

The use of drugs

Experience of Almiba administration in palliative therapy of cancer patients in the hospice department

Charniakova L., Slobodskaya N. 473

Practice

Rare case of the primary malignant fibrous histiocytoma of the kidney

Moloshok A., Jerko I., Rudich Y., Sheremok L. 476

Molecular-genetic ways of early detection of gastric cancer in patients with chronic atrophic gastritis

Djuraev M., Yusupbekov A., Abdujapparov S., Turdikulova Sh., Dolimova D., Qodirov H., Abdurahmonov B. 479

Башня Зиммера была построена в начале XV века как составная часть оборонительных укреплений города. В 1928 году часовщик Луи Зиммер создал и подарил городу уникальные Юбилейные часы с 57 циферблатами (из них 13 расположено с внешней стороны башни).

Поражающая воображение конструкция показывала не только время на всех континентах, но и фазы Луны, время приливов и отливов, а также ряд других астрономических явлений.



Исаев И.Г., Гулиев Ф.А., Акперов К.С., Везирова З.Ш.
Национальный центр онкологии, Баку, Азербайджан

Isayev I., Guliyev F., Akperov K., Vesirova Z.
National Center of Oncology, Baku, Azerbaijan

Отдаленные результаты гормоно-лучевой терапии рака предстательной железы промежуточного и высокого риска

Delayed results of hormonal and radiotherapy
for intermediate and high risk prostate carcinoma

Резюме

Рак предстательной железы является одной из самых распространенных злокачественных опухолей у мужчин во всем мире. Сегодня сочетание гормональной и лучевой терапии является основным вариантом лечения пациентов с раком предстательной железы среднего и высокого риска. Но эти методы могут быть использованы в разных последовательностях – неoadъювантной, сопутствующей и адъювантной гормональной терапии. В свою очередь, гормональная терапия сама по себе может быть организована по-разному. В нашем исследовании были проанализированы результаты 5-летней выживаемости 97 пациентов, получивших гормональное лечение с последующей лучевой терапией (общая доза 70–74 Гр). Мы пришли к выводу, что этот комбинированный метод лечения может быть целесообразным для пациентов с местнораспространенным раком простаты.

Ключевые слова: рак предстательной железы, гормональная терапия, лучевая терапия.

Abstract

Prostate carcinoma is one of the wide spread malignant tumors among men all over the world. Today combination of hormonal and radiotherapy is the main treatment option for patients with intermediate and high risk prostate cancer. But these methods could be used in different sequences – neoadjuvant, concomitant and adjuvant hormonal therapy. In turn, hormonal therapy itself may be arranged in different ways. In our research we analyzed 5 year survival results for 97 patients who received the hormonal treatment with subsequent external beam radiotherapy (total dose 70-74 Gy). We came to conclusion that this combined treatment modality may be a feasible option for patients with locally advanced prostate carcinoma.

Keywords: prostate cancer, hormonal therapy, radiotherapy.

ВВЕДЕНИЕ

Рак предстательной железы (РПЖ) – одна из наиболее широко распространенных злокачественных опухолей у мужчин [1]. Начиная с 50 лет частота этого вида злокачественных новообразований у мужчин растет, достигая пика к 71-му году жизни. Если принять во внимание, что в экономически развитых странах продолжительность жизни увеличивается и имеется общемировая тенденция к старению населения, соответственно, возрастает и заболеваемость [2, 3].

В Азербайджане заболеваемость РПЖ относительно невысока, составляет 4,2 на 100 000 населения и стоит на четвертом месте среди онкологических заболеваний у мужчин [4]. При этом несмотря на развитие новых методов диагностики и разработки скрининговых программ, позволяющих выявлять патологию на ранних стадиях, в большинстве случаев РПЖ диагностируется в поздней, местнораспространенной стадии ($T_{3-4}N_{0-1}M_0$) [6, 7]. В настоящее время одним из основных методов лечения пациентов с местнораспространенным РПЖ является комбинация гормональной и лучевой терапии (ЛТ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью изучения эффективности гормоно-лучевой терапии при местнораспространенном РПЖ нами было проведено исследование, в которое вошли 97 пациентов, прошедших курс лечения в Национальном центре онкологии Азербайджанской Республики с 2007 по 2011 г. В исследование включали первичных пациентов с гистологически подтвержденной аденокарциномой предстательной железы промежуточной и высокой группы риска ($T2b-T3b$, ПСА ≥ 10 нг/мл, баллы по Глиссону ≥ 7 , N1) со статусом по шкале Карновского $>60\%$. Обследование перед началом лечения включало в себя сбор анамнеза, медицинский осмотр, степень дизурических явлений по таблице IPSS, оценку общего состояния пациента по шкале Карновского, лабораторные исследования – общий и биохимический анализы крови, измерение уровня простатспецифического антигена (ПСА), определение кислой фосфатазы сыворотки крови, определение содержания тестостерона в сыворотке

Таблица 1
Характеристика клинического материала

Количество пациентов, абс. число	97
Средний возраст, лет	64,6 (51–74)
Баллы по Глиссону	
4–6	27 (27,8%)
7	41 (42,3%)
8–10	29 (29,9%)
cT стадия	
cT2	42 (43,3%)
cT3	51 (52,6%)
cT4	4 (4,1%)
Значение ПСА, нг/мл	
<10	12 (12,4%)
10–20	49 (50,5%)
>20	36 (37,1%)
Состояние региональных ЛУ (МРТ/КТ)	
позитивные (N1)	21 (21,7%)
негативные (N0)	76 (78,3%)
Среднее IPSS	16,4 \pm 1,7

крови. Радиологическое исследование состояло из рентгенографии органов грудной клетки и сканирования костей. Для оценки степени местного распространения самой опухоли, а также состояния лимфатических узлов обязательно проводились МРТ таза и трансректальное УЗИ. В табл. 1 приведена характеристика клинического материала.

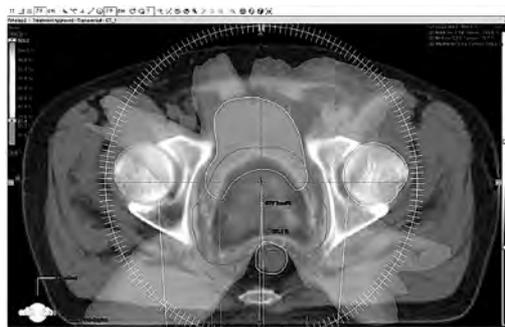
Всем пациентам до этапа лучевой терапии была проведена гормонотерапия в объеме максимальной андрогенной блокады. Лучевая терапия проводилась на линейных ускорителях с энергией фотонных пучков 6–15 МэВ. В случаях наличия метастазов в лимфатических узлах или вероятности таковой 15% и больше, рассчитанной по таблице Roach [8], в поля облучения включались как предстательная железа, так и регионарные лимфатические узлы до уровня бифуркации аорты (обтураторные, общие, наружные и внутренние подвздошные, прекрестцовые). В остальных случаях облучению подвергалась только простата – объем облучаемых тканей включал предстательную железу с окружающими тканями в границах, достаточных для того, чтобы покрыть область возможного распространения опухоли.

С целью повышения дозы в мишени и при этом ее минимизации в окружающих тканях и органах применялись прецизионные методы дистанционной лучевой терапии – 3D-конформальная радиотерапия, а с 2010 г. – модулированная по интенсивности лучевая терапия (IMRT) и волюметрическая модулированная арка-терапия (VMAT) (см. рисунок). Разовая доза составляла 2 Гр за фракцию, суммарные – 50 Гр на весь таз и 70–72 Гр на простату.

Биохимический контроль определялся как достижение уровня ПСА ≤ 4 нг/мл. Рецидив заболевания определялся по критериям RTOG-ASTRO (Группы Радиотерапии и Онкологии и Американского Общества Радиотерапии и Онкологии): повышение уровня ПСА на 2 нг/мл и более от минимального значения [9]. Содержание ПСА измерялось каждые 3 месяца во время контрольных осмотров пациентов.

Из медицинской документации каждого пациента получены демографические данные, показатели распространенности заболевания, основные пред- и послеоперационные прогностические факторы, а также данные о лечении и его результатах. Анализ результатов и построение диаграмм проводились при использовании статистического программного пакета SPSS 18.0 для Windows.

Продолжительность наблюдения оценивалась с первого дня лечения РПЖ до последнего дня наблюдения или смерти. Анализ безрецидивной и канцер-специфической выживаемости после проведенного лечения оценивался по методу Каплана – Майера, различия выживаемости определялись с помощью log-rank теста. Статистически значимыми считали различия с уровнем значимости на 95% ($p < 0,05$).



Изодозное распределение при дистанционной лучевой терапии рака простаты методом VMAT

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в табл. 2.

Гормонотерапия РПЖ – давно известный метод лечения, который в основном применялся как паллиативное лечение при распространенных опухолевых процессах. Однако позже антиандрогенную терапию стали все чаще использовать в комбинации с хирургическим лечением и лучевой терапией [10–12].

В свою очередь лучевая терапия в последние десятилетия благодаря развитию и совершенствованию новой высокоточной радиотерапевтической техники с мегавольтным излучением прочно зарекомендовала себя и является одним из ведущих консервативных методов лечения онкологических больных во всех стадиях, особенно при распространенных формах опухолевого процесса. Создание и широкое внедрение в клиническую практику прецизионных методов ЛТ, таких как 3D-конформная дистанционная ЛТ, модулированная по интенсивности ЛТ, стереотаксическая ЛТ, 3D-брахитерапия, позволило значительно повысить дозы радиоактивного излучения, подводимые к предстательной железе, что, соответственно, привело к повышению эффективности лечения в целом [13, 14].

Возможно несколько вариантов сочетания дистанционной лучевой терапии и гормонотерапии, каждый из которых по-своему был обоснован. Неоадъювантная гормонотерапия могла бы вызывать уменьшение объема опухоли и тем самым позволила бы подводить высокие дозы ионизирующего излучения с минимальным повреждением окружающих тканей; проведение гормонотерапии одновременно с лучевой терапией может потенцировать эффекты последнего; и, наконец, адъювантная гормонотерапия может поддерживать эффект, полученный от лучевой терапии [15]. RTOG провела исследования по изучению различных методов комбинации антиандрогенной и лучевой терапии РПЖ. Так, в исследовании RTOG 86-10 пациенты с местнораспространенными формами РПЖ получали гозерелин и флутамид за два месяца до начала и в течение всего курса лучевой терапии. Результаты неоадъювантной и одновременной гормоно-лучевой терапии показали улучшение общей и безрецидивной выживаемости, но только среди пациентов с баллами по Глисону 2–6 при отсутствии достоверной разницы у пациентов с баллами 7 и выше. Однако исследование RTOG 85-31, в котором пациенты получали неоадъювантную гормонотерапию, выявило улучшение показателей выживаемости среди пациентов с баллами по Глисону 7 и больше при отсутствии таковых у пациентов с баллами 2–6 [16, 17].

Анализ 10-летней онкоспецифической выживаемости показал, что наиболее эффективным методом лечения пациентов в данной стадии заболевания является гормоно-лучевая терапия. При использовании гормоно-лучевой терапии этот показатель составляет 63,5%, при гормонотерапии – 47,9% и при ЛТ – 24,5%. Эти данные позволили предположить, что эффект, полученный при проведении ЛТ, необходимо дополнить длительной гормонотерапией [18]. В исследовании Porter et al.

Таблица 2
Результаты 5-летнего наблюдения

Общая выживаемость	69,7%
Баллы по Глисону	
≤7	81,2%
>7	63,4%
Безрецидивная выживаемость	57,5%

оценивались результаты лечения 208 пациентов, из которых 106 получили только ЛТ, а 102 – гормоно-лучевую терапию (ципротерона ацетат в течение 12 недель до начала ЛТ). Трехлетняя безрецидивная выживаемость (на основании биопсии предстательной железы) составила 54,7% в группе комбинированного лечения и 34,6% в группе ЛТ [19].

В начале 80-х гг. Группа лучевой терапии в онкологии (RTOG) начала изучение потенциальной пользы гормональной терапии в сочетании с дистанционной лучевой терапией в лечении РПЖ. После завершения нескольких исследований II фазы в середине 80-х гг. RTOG приступила к двум исследованиям III фазы – RTOG 86-10 и RTOG 85-31. В исследование RTOG 85-31 были включены 945 пациентов, из которых 477 получили ЛТ с последующей адъювантной терапией гозерелином вплоть до прогрессирования заболевания, а 468 пациентов – ЛТ; гормонотерапия гозерелином начиналась лишь после развития рецидива заболевания. Показатели безрецидивной выживаемости: 5-летняя – 62% и 44%, 10-летняя – 37% и 23% были, соответственно, в пользу адъювантной гормонотерапии [20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что у пациентов с РПЖ среднего и высокого риска (клиническая стадия Т3, наличие метастатического поражения лимфатических узлов, высокие значения по Глиссону и ПСА) длительное применение адъювантной гормонотерапии может быть стандартным вариантом лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. (2014) Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.*, vol. 64, pp. 9–29.
2. Bray F., Ren J.S., Masuyer E., Ferlay J. (2013) Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*, vol. 132, no 5, pp. 1133–45.
3. Carlsson S.V., Roobol M.J. (2017) Improving the evaluation and diagnosis of clinically significant prostate cancer in 2017. *Curr Opin Urol.*, vol. 27, no 3, pp. 198–204.
4. Aliev D., Mardanli F., Guliev F. (2014) Epidemiologicheskie aspekti zlokachestvennih novoobrazovaniy v Azerbaidzhanskoi Respublike za 2008–2013 gg. [Epidemiological aspects of malignant tumors in the Republic of Azerbaijan for 2008-2013]. *Azərbaycan Onkologiya Jurnalı*, vol. 2, pp. 32–39.
5. Froehner M., Koch R., Propping S., Liebeheim D. (2017) Level of education and mortality after radical prostatectomy. *Asian J Androl.*, vol. 19, no 2, pp. 173–177.
6. Weiner A.B., Matulewicz R.S., Eggener S.E., Schaeffer E.M. (2016) Increasing incidence of metastatic prostate cancer in the United States (2004–2013). *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, vol. 19, no 4, pp. 395–397.
7. Reese A.C., Wessel S.R., Fisher S.G., Mydlo J.H. (2016) Evidence of prostate cancer “reverse stage migration” toward more advanced disease at diagnosis: Data from the Pennsylvania Cancer Registry. *Urol Oncol.*, vol. 34, no 8, pp. 335.e21-8.
8. Dirix P., Haustermans K., Junius S., Withers R., Oyen R., Van Poppel H. (2006) The role of whole pelvic radiotherapy in locally advanced prostate cancer. *Radiotherapy and oncology*, vol. 79, pp. 1–14.
9. Roach M., Hanks G., Thames H. (2006) Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, vol. 65, pp. 965–974.
10. Pilepich M.V., Winter K., John M.J. (2001) Phase in RTOG trial 86-10 of androgen deprivation adjuvant to definitive radiotherapy in locally advanced carcinoma of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, vol. 50, pp. 1243–52.

11. Bolla M., Collette L., Blank L. (2002) Long term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): A phase IE randomized trial. *Lancet*, vol. 360, pp. 103–8.
12. Hanks G.E., Pajak T.F., Porter A. (2003) Phase in trial of longterm adjuvant androgen deprivation after neoadjuvant hormonal cytoreduction and radiotherapy in locally advanced carcinoma of the prostate: The Radiation Therapy Oncology Group protocol 92-02. *J Clin Oncol*, vol. 21, pp. 3972–8.
13. El-Saghire H., Vandevoorde C., Ost P., Monsieurs P. (2014) Intensity modulated radiotherapy induces pro-inflammatory and pro-survival responses in prostate cancer patients. *Int J Oncol.*, vol. 17, p. 226.
14. Keilholz L., Willner J., Thiel H., Zamboglou N. (2014) Time management in radiation oncology: evaluation of time, attendance of medical staff, and resources during radiotherapy for prostate cancer : The DEGRO-QUIRO trial. *Strahlenther Onkol.*, vol. 190, no 1, pp. 17–25.
15. Nomiya T., Tsuji H., Toyama S., Maruyama K., Nemoto K., Tsujii H., Kamada T. (2013) Management of high-risk prostate cancer: radiation therapy and hormonal therapy. *Cancer Treat Rev.*, vol. 39, no 8, pp. 872–8.
16. Lawton C., Bae K., Pilepich M., Hanks G., Shipley W. (2008) Long-term treatment sequelae after external beam irradiation with or without hormonal manipulation for adenocarcinoma of the prostate: analysis of radiation therapy oncology group studies 85-31, 86-10, and 92-02. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, vol. 70, no 2, pp. 437–41.
17. Milecki P., Kwias Z., Martenka D. (2007) Radiotherapy combined with hormonal therapy (RT-HT) in prostate cancer patients with low, intermediate, and high risk of biochemical recurrence: perspective and therapeutic gain analysis. *Neoplasma*, vol. 54, no 1, pp. 7–15.
18. Miljenko V. Pilepich, Kathryn Winter, Colleen A. Lawton, Robert E. Krisch (2005) Adjuvant androgenic blockade after teleradiotherapy for prostate cancer: long-term results of phase III RTOG 85-31 study. *Int. J. Radiation Oncology. Biol. Phys.*, vol. 61, no 5, pp. 1285–1290.
19. Porter A., Elhilali M., Manji M. (1997) A phase III randomized trial to evaluate the efficacy of neoadjuvant therapy prior to curative radio-therapy in locally advanced prostate cancer patients – a Canadian Urologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol.*, vol. 16: 315a, abstr. 1123.
20. Soulie M, Salomon L. (2015) Comparative oncologic and functional outcomes of prostate cancer surgery with other curative treatments. *Prog Urol.*, vol. 25, no 15, pp. 1067–85.

Поступила/Received: 04.05.2017

Контакты/Contacts: sevilm@rambler.ru

Киселёв Л.П., Алейникова О.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Kisialeu L., Aleinikova O.
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Анализ 108 клинических исходов саркомы Юинга у детей Республики Беларусь за 15-летний период наблюдения

Ewing's sarcoma in Belarus Republic: 15-year survival rate
and clinical features of 108 pediatric patients

Резюме

Терапия саркомы Юинга (СЮ) предусматривает локальный контроль (операция и/или лучевая терапия) и обязательное использование системной терапии. Целью исследования была оценка долгосрочных показателей выживаемости и анализ характеристик пациентов с благоприятными и неблагоприятными исходами заболевания. В анализ включены 108 пациентов с СЮ за период наблюдения с 1999 по 2014 г. Пациенты с пПНЭО исключены из исследования. Данные о пациентах получены от детского субканцер-регистра (включен в Интернациональное агентство исследования рака (IARC)). Общая 15-летняя выживаемость для всей когорты пациентов составила 49,5%, при локализованных и метастатических формах она была 64,8% и 19,7% соответственно. Не было выявлено значимых отличий в характеристиках пациентов (пол, возраст, уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ), размер и локализация опухоли и др.), позволяющих прогнозировать исход заболевания перед началом терапии. Можно констатировать, что показатели долгосрочной выживаемости пациентов с СЮ в Республике Беларусь соответствуют стандартам стран с развитой структурой здравоохранения. Метастатические формы заболевания требуют дальнейшего поиска терапевтических подходов. Новые маркеры необходимы для раннего прогнозирования трети пациентов с локализованными формами болезни, которые окажутся резистентными к стандартным схемам лечения.

Ключевые слова: саркома Юинга, лечение, выживаемость, дети.

Abstract

Treatment of Ewing sarcoma (ES) include local control (surgery and/or radiation) and systemic therapy as an essential component. The aim of this study was to evaluate the long-term survival and to investigate whether patient characteristics differ between cases with favorable and unfavorable outcomes. 108 pediatric patients from the Belarus Republic with ES (not with peripheral primitive neuroectodermal tumor) of bone or soft tissue reported to the sub-cancer registry database (included in International Agency for Research on Cancer (IARC)) from 1999 to 2014 were evaluated. Survival rate was estimated via the

Kaplan-Meier method and compared using log-rank tests and Cox proportional hazard models. Overall survival (OS) was superior for localized EES compared with metastatic forms (64.8% vs 19.7%; $P < 0.0001$). Fifteen-year OS for the entire cohort of patients was 49.5%. Known clinical characteristics (age, sex, tumors volume and other) did not differ between patients with localized SE depending on the availability of favorable or unfavorable outcomes. Treatment results for patients with ES from the Belarus Republic comply with generally accepted standards. Patients with metastatic status need new treatment strategies. Searching for new predictive markers is necessary for early detection of resistant to conventional treatment patients with localized ES.

Keywords: Ewing sarcoma, children, treatment, survival.

ВВЕДЕНИЕ

Саркома Юинга (СЮ) возникает в костях или мягких тканях, и частота встречаемости заболевания в популяции младше 18 лет составляет примерно 3 случая на миллион детского населения; имеет место некоторое преобладание у лиц мужского пола (55% мальчиков против 45% девочек). Для всеобъемлющей оценки результатов терапии и показателей выживаемости необходимым условием является формирование канцер-регистров с целью регистрации пациентов, стадирования онкологического процесса и посттерапевтического наблюдения [1–4]. Примитивная периферическая нейроэктодермальная опухоль (пПНЭО) отличается от классической СЮ на основании наличия маркеров нейрональной дифференцировки, и ранее она рассматривалась как отдельная нозология [4, 5]. Поскольку значительная часть пациентов с пПНЭО лечилась по схемам, отличным от классической СЮ, все случаи с пПНЭО исключены из данного исследования.

От четверти до трети пациентов с СЮ имеют метастатическое распространение и, соответственно, IV стадию онкологического процесса. Легкие – наиболее частое место обнаружения метастазов, затем следуют кости и костный мозг. Традиционно с худшим прогнозом ассоциируется центральная и тазовая локализация, большой объем новообразования, повышенный уровень ЛДГ, более старший возраст пациента и ответ опухоли на проведенное лечение [5, 6]. Однако наличие метастатического распространения рассматривается как наиболее значимый фактор прогноза, и большинство исследователей стратифицируют пациентов на группы риска исходя только из этого признака [7, 8]. Около 4 десятилетий назад, до начала эры химиотерапии, выживало не более 10% пациентов с СЮ. Пациенты погибали в течение 2 лет от субклинических метастазов заболевания, что и обусловило необходимость применения системной терапии для курации болезни. В результате этого на сегодняшний день при использовании современных мультимодальных терапевтических режимов, включающих комбинацию химиотерапии, операции и лучевой терапии, уровень излечиваемости локализованных форм СЮ достигает 60–70% [8, 9]. Однако эти достижения не привели к увеличению количества положительных исходов для пациентов с наличием метастазов на момент постановки диагноза; показатели выживаемости для них не превышают 15–25%, несмотря на использование высокоинтенсивных химиотерапевтических режимов [8, 9]. В настоящем исследовании приведены результаты лечения 108 пациентов в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (РНПЦДОГИ) Республики Беларусь (РБ) за 15-летний период.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка показателей долгосрочной выживаемости и анализ исходов пациентов с СЮ для установления отличий в клинико-патологических характеристиках пациентов с благоприятными и неблагоприятными результатами терапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были использованы данные Детского субканцер-регистра (включен в Интернациональное агентство исследования рака (IARC)), в котором с 1999 по 2014 г. зарегистрированы 108 пациентов с СЮ, диагностированных в РНПЦДОГИ, который является единственным учреждением для лечения детей и подростков РБ до 18-летнего возраста [10]. Для постановки диагноза использовались гистологический, иммуногистохимический и молекулярно-биологический методы. Пациентам осуществлялся локальный контроль (операция, операция + лучевая терапия, только лучевая терапия) и проводилось программное системное лечение. Использовались 4 режима системной химиотерапии. Режим А базировался на рекомендациях Европейского общества онкологов после 1992 г.: использовались винкристин, доксорубицин, дактиномицин, этопозид, а также алкилирующие агенты ифосфамид и циклофосфамид в режиме рандомизации [11]. Индукционная схема режима В соответствовала рекомендациям американских детских онкологов для костной СЮ и подразумевала проведение в альтернирующем режиме блоков винкристин/доксорубицин/циклофосфамид и этопозид/ифосфамид [12]. Консолидирующая терапия режима В проводилась посредством высоких доз бусульфана и мелфалана с поддержкой периферической стволовой клеткой [13]. Режим С базировался на рекомендациях Европейского общества онкологов после 1999 г.: индукционные блоки были четырехкомпонентными (винкристин, доксорубицин, ифосфамид и этопозид), консолидирующая терапия была трехкомпонентной (винкристин, ифосфамид, актиномицин Д) [14, 15]. Для селективных пациентов режима D, наряду с четырехкомпонентной индукцией и трехкомпонентной консолидацией, применялась блокада ангиогенеза препаратом бевацизумаб на основании уровней маркеров ангиогенеза в ткани опухоли перед системной терапией.

После окончания лечения пациенты наблюдались Детским субканцер-регистром Республики Беларусь с постоянным обновлением статуса. Длительность бессобытийной выживаемости (БСВ), общей выживаемости (ОВ) и кумулятивной частоты рецидива (КЧР) исчислялась от времени постановки инициального диагноза.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы R-statistics версия 3.2.0, R Foundation for Statistical Computing, лицензия GNU GPL. Оценка статистической значимости различий между сравниваемыми количественными показателями проводилась U-критерием теста Манна – Уитни. Сравнение в группах по индивидуальным параметрам проводилось с помощью теста χ^2 . Кривые ОВ и БСВ выстраивали по методу Каплана – Мейера (Kaplan – Meier); для сравнительной оценки достоверности различий использовали логранговый критерий (log-rank test). Кумулятивная частота возникновения событий рассчитывалась методом конкурирующих рисков, различия кумулятивных частот оценивались с использованием теста Gray. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки менее 5% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У 5 из 108 (4,6%) пациентов (1 с локализованной формой, 4 с метастатической) констатированы отрицательные события, не связанные с возвратом заболевания. Смерть от инфекционных осложнений без признаков наличия рецидива отмечена в 4 случаях (1 локальная, 3 метастатические формы), и у 1 пациента (метастатическая форма) имела место вторая опухоль (остеосаркома) после окончания лечения основного заболевания.

Учитывая, что наличие метастатического поражения на момент постановки диагноза является наиболее значимым фактором прогноза, клинико-патологические характеристики пациентов с локализованными и метастатическими формами СЮ оценивались отдельно.

Клинико-патологические характеристики пациентов с локализованными формами СЮ представлены в табл. 1. Пациенты были разделены на 2 группы на основании наличия или отсутствия рецидива / продолженного роста заболевания. Как видно из данных, представленных в табл. 1, мужской пол несколько преобладал в группе с рецидивами (56,5% vs 39,6%), однако относительные значения количества пациентов возрастом старше 14 лет были больше в группе с благоприятными исходами заболевания (30,4% vs 35,4%). Уровень ЛДГ, наряду с размерами опухолевого очага, варьировался в широких диапазонах и значимо не отличался при оценке медианных значений. Наиболее частой локализацией первичного опухолевого очага в обеих группах были конечности. Обращает на себя внимание больший процент локализации опухоли в костях таза в группе пациентов с наличием ремиссии.

Все случаи локализации патологического процесса в позвонках имели благоприятный исход заболевания. Также как интересное наблюдение можно отметить тот факт, что все случаи локализации опухоли в малоберцовой кости и предплечье оказались в группе рецидивов. Не констатировано значимых различий в проценте широких резекций, так же как и в относительном количестве пациентов, которым было выполнено хирургическое вмешательство.

Лучевая терапия в качестве единственного метода местного контроля была выполнена в 52,4% случаев в группе с рецидивами и в 43,7% в группе с благоприятными исходами заболевания локализованной СЮ. Отмечен больший удельный вес (13,0% vs 4,2%) случаев использования протокола химиотерапии образца 1992 г. в группе с неблагоприятными исходами заболевания. Режим химиотерапии D чаще применялся у пациентов с благоприятными исходами. Гистологический ответ оценивался только у пациентов с полным хирургическим удалением новообразования; не отмечено значимой разницы в относительном количестве пациентов с выраженным патоморфозом (менее 10% витальных опухолевых клеток) в сравниваемых группах.

Клинико-патологические характеристики пациентов с метастатическими формами СЮ представлены в табл. 2. Соответственно ожидаемому плохому прогнозу, у 24 из 32 пациентов в этой когорте (75%) был констатирован рецидив заболевания. Отмечено преобладание лиц мужского пола в группе с рецидивами метастатической СЮ. Констатировано, что ни одного случая благоприятного исхода заболевания не было у пациентов старше 14-летнего возраста. Также отмечено, что за 15-летний период не было случаев метастатического распространения при условии локализации опухолевого очага в скелете верхнего плечевого пояса (ключица, лопатка, плечо, предплечье, кисть). Пациенты, которым было выполнено хирургическое удаление опухоли, локализовались в группу с благоприятным исходом заболевания. Процент использованных режимов химиотерапии был сопоставим в сравниваемых группах. Среди выживших пациентов с метастатической СЮ большинство (62,5%) составили

случаи с изолированным поражением легких. В группе с рецидивами ситуация была обратная и большинство (79,9%) составили случаи с поражением костей, костного мозга или мультисистемным метастатическим распространением.

Таблица 1
Клинико-патологические характеристики пациентов с локализованными формами СЮ

Характеристики	Пациенты с рецидивом, n=23		Пациенты без рецидива, n=48		P
	n	%	n	%	
Пол					
Мужской	13	56,5	19	39,6	0,1795
Женский	10	43,5	29	60,4	
Возраст, годы					
≤14	16	69,6	31	64,6	0,6779
>14	7	30,4	17	35,4	
ЛДГ, ед/мл медиана (мин. – макс.)	450 (144–779)	–	427 (166–1028)	–	0,4323
Анатомическая локализация					
Бедро	6	26,7	9	18,9	0,4785
Большеберцовая кость	4	17,2	10	22,3	0,7330
Малоберцовая кость	3	13,1	0	0	0,0105
Стопа	2	8,6	2	4,2	0,4386
Ключица	0	0	2	4,2	0,3207
Лопатка	1	4,3	1	2,1	0,5894
Ребро	0	0	3	6,3	0,2205
Плечо	1	4,3	7	14,7	0,2018
Предплечье	2	8,6	0	0	0,0382
Кисть	0	0	1	2,1	0,4857
Череп	2	8,6	1	2,1	0,1949
Позвонки	0	0	3	6,3	0,2205
Таз	2	8,6	9	18,9	0,2732
Размер опухоли, см медиана (мин. – макс.)	8,9 (2,4–20,0)	–	8,4 (3,0–20,0)	–	0,8697
Объем опухоли, мл медиана (мин. – макс.)	124 (11–330)	–	114 (18–754)	–	0,4547
Операция					
Широкая резекция	6	26,1	16	34,1	0,5366
Частичная резекция	4	17,4	10	20,1	0,7330
Не выполнялась	13	56,5	22	45,8	0,3992
Локальный контроль					
Только операция	7	33,3	15	31,3	0,9446
Операция и облучение	3	14,3	12	25,0	0,2481
Только облучение	11	52,4	21	43,7	0,7467
Гистологический ответ					
Некроз ≥90%	5	83,4	16	76,2	0,3165
Некроз <90%	1	16,6	5	23,8	0,3896
Режим химиотерапии					
Режим А*	3	13,0	2	4,2	0,1713
Режим В	12	52,3	16	33,6	0,1285
Режим С	6	26,0	14	28,6	0,7872
Режим D	2	8,7	16	33,6	0,0255

Примечание:

* описание режимов химиотерапии представлено в главе «Материалы и методы».

Таблица 2
Клинико-патологические характеристики пациентов с метастатическими формами СЮ

Характеристики	Пациенты с рецидивом, n=24		Пациенты без рецидива, n=8		P
	n	%	n	%	
Пол					
Мужской	18	75,0	4	50,0	0,1864
Женский	6	25,0	4	50,0	
Возраст, годы					
≤14	11	45,8	8	100	0,0069
>14	13	54,2	0	0	
ЛДГ, ед/мл медиана (мин. – макс.)	622 (260–2910)	–	603 (290–808)		0,5749
Анатомическая локализация					
Бедро	7	29,4	2	25,0	0,8204
Большеберцовая кость	1	4,2	1	12,5	
Малоберцовая кость	1	4,2	1	12,5	0,3991
Стопа	0	0	0	0	
Ключица	0	0	0	0	0,3991
Лопатка	0	0	0	0	
Ребро	0	0	0	0	0,9886
Плечо	0	0	0	0	
Предплечье	0	0	0	0	0,5395
Кисть	0	0	0	0	
Череп	0	0	0	0	0,9886
Позвонки	3	12,6	1	12,5	
Таз	12	49,6	3	37,5	0,5395
Размер опухоли, см медиана (мин. – макс.)	9,6 (3,0–30,0)	–	11,3 (5,0–14,0)	–	0,1157
Объем опухоли, мл медиана (мин. – макс.)	114,0 (18,0–3852,0)	–	192,9 (28,4–514,2)	–	0,2670
Операция					
Широкая резекция	2	8,4	3	37,5	0,0491
Частичная резекция	1	4,2	0	0	
Не выполнялась	21	87,4	5	62,5	0,1167
Локальный контроль					
Только операция	0	0	3	37,5	0,0016
Операция и облучение	3	14,3	0	0	
Только облучение	18	85,7	5	62,5	0,2935
Гистологический ответ					
Некроз ≥90%	3	100,0	2	100,0	0,3991
Некроз <90%	0	0	0	0	
МТС изолированно в легкие	5	20,1	5	62,5	0,0277
Другие	19	79,9	3	37,5	
Режим химиотерапии					
Режим А*	0	0	0	0	0,9986
Режим В	15	62,5	5	62,5	
Режим С	0	0	1	12,5	0,07840,5191
Режим D	9	37,5	2	25,0	

Примечание:

* описание режимов химиотерапии представлено в главе «Материалы и методы».

Мы оценили показатели БСВ, ОВ и КЧР за 15-летний период наблюдения как для всей когорты пациентов с СЮ, так и отдельно для метастатических и локализованных форм заболевания.

Как представлено на рис. 1, БСВ всей когорты СЮ составила 49,2%, для пациентов с метастатическими и локализованными формами она была 19,5% и 64,5% соответственно.

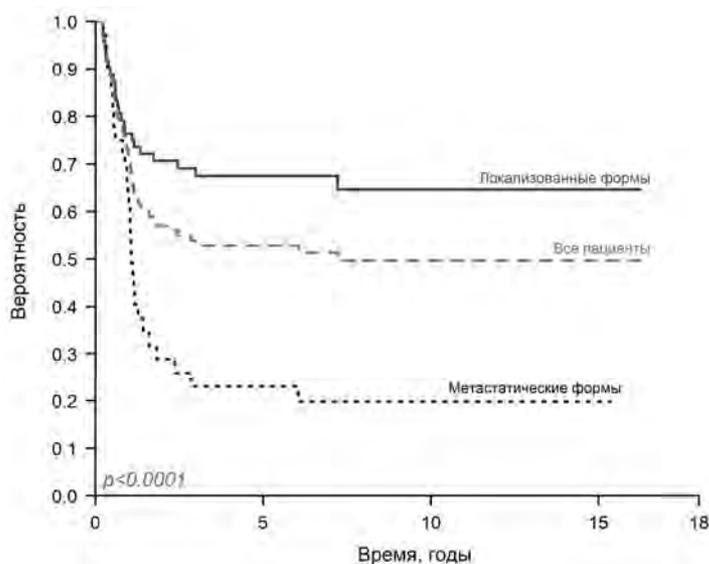


Рис. 1. Бессобытийная выживаемость пациентов с СЮ в зависимости от распространенности процесса

Локализованные формы: n=72, 48 без события [64,5%±6,0%]

Все пациенты: n=108, 56 без события [49,2%±5,1%]

Метастатические формы: n=36, 8 без события [19,5%±6,9%]

ОВ (рис. 2) для всей когорты составила 49,5%, для пациентов с метастатическими и локализованными формами она была 19,7% и 64,8% соответственно.

КЧР (рис. 3) для всей когорты составила 45,2%, для пациентов с метастатическими и локализованными формами она была 68,6% и 33,9% соответственно.

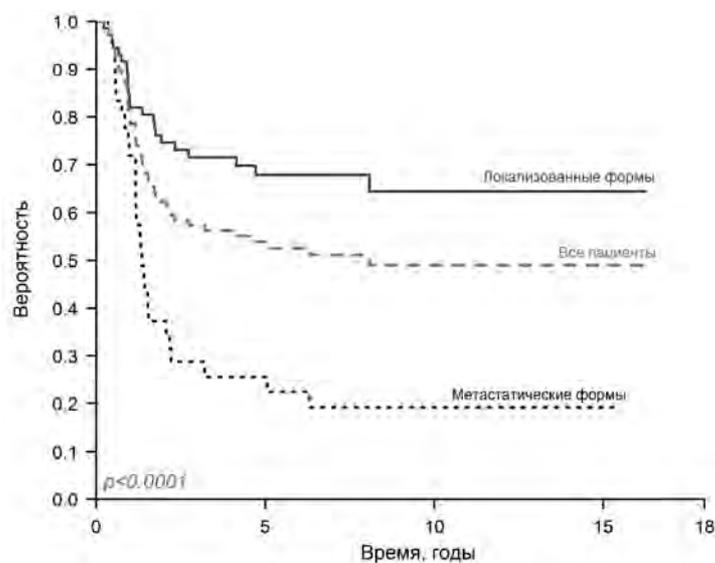


Рис. 2. Общая выживаемость пациентов с СЮ в зависимости от распространенности процесса

Локализованные формы: n=72, 49 живы [64,8%±6,0%]

Все пациенты: n=108, 57 живы [49,5%±5,3]

Метастатические формы: n=36, 8 живы [19,7%±6,8%]

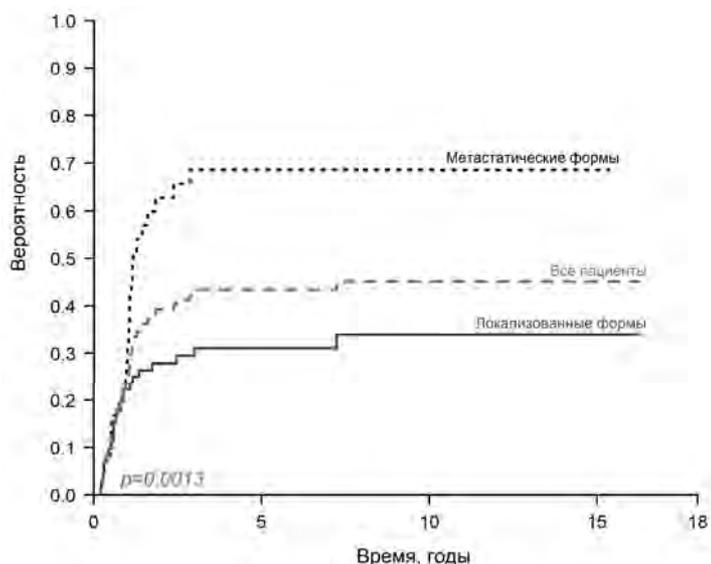


Рис. 3. Кумулятивная частота развития рецидивов у пациентов с саркомой Юинга в зависимости от распространенности процесса

Локализованные формы: n=72, 23 рецидива [33,9%±6,0%]

Все пациенты: n=108, 47 рецидивов [45,2%±5,0%]

Метастатические формы: n=36, 24 рецидива [68,6%±8,1%]

Таким образом, лечение пациентов с саркомой Юинга предусматривает местный контроль (операция и/или лучевая терапия) и системную полихимиотерапию. До настоящего момента не определена оптимальная стратегия системного лечения: в Северной Америке и Западной Европе используются различные терапевтические планы. Современные результаты лечения значительно лучше таковых несколько десятилетий назад, но даже максимально токсичные схемы не позволяют достигнуть прогресса в терапии подавляющего большинства пациентов с метастатическим поражением и около трети локализованных форм заболевания [14, 15]. Соответственно историческим этапам, в РБ использовались различные подходы для терапии пациентов с саркомой Юинга. В настоящем исследовании представлены результаты лечения за 15-летний период наблюдения и осуществлен анализ клинко-патологических характеристик пациентов с благоприятными и неблагоприятными исходами заболевания.

При оценке характеристик пациентов с локализованной саркомой Юинга при рецидиве заболевания и находящихся в ремиссии констатируется сопоставимость сравниваемых групп по большинству сравниваемых параметров. Такие параметры, как уровень ЛДГ и размеры новообразования, характеризуются значительным диапазоном и не могут однозначно характеризовать ту или иную сравниваемую когорту при локализованных формах заболевания. В группе с неблагоприятными исходами заболевания несколько преобладали пациенты мужского пола, но принадлежность к старшей возрастной группе не оказала влияние на результат терапии. Наиболее частой локализацией первичного опухолевого очага в обеих группах были конечности. Обращает на себя внимание больший процент локализации опухоли в костях таза в группе пациентов с наличием ремиссии. Не отмечено разницы в проценте случаев с выраженным посттерапевтическим патоморфозом, но необходимо отметить, что исследование проводилось только

при возможности полного удаления опухолевого очага. Можно констатировать, что для локализованных форм заболевания наблюдается значительная вариабельность в оценке значений известных клинических характеристик. На сегодняшний день они имеют ограниченное влияние на предсказание неудовлетворительного исхода и формирование плана инициальной химиотерапии; в базовых современных протоколах лечения индукционная терапия, как правило, идентична у всех первичных пациентов [6, 7, 12, 14]. Поиск новых прогностических маркеров, вероятно, связанный с молекулярно-биологическими маркерами новообразования, необходим для возможности стратификации пациентов этой когорты на группы риска перед началом терапии [6, 7, 15].

Наличие метастатического поражения остается неоспоримым фактором плохого клинического исхода заболевания, и эта ситуация практически неизменна за несколько десятилетий курации пациентов с СЮ [8, 9]. В нашем исследовании констатировано отсутствие благоприятного исхода у пациентов старше 14 лет с метастатическими формами заболевания. В группе пациентов с ремиссией большинство было с изолированными метастазами в легких, что подтверждает несколько лучший прогноз выживаемости для этой когорты по сравнению с метастазами других локализаций [6, 7].

При объединенной оценке клинических исходов 1519 пациентов с костной СЮ Appelbaum et al. констатировали 62,6% вероятность общей выживаемости для локализованных форм [9]. Данные европейских и североамериканских авторов свидетельствуют, что результаты БРВ и ОВ для локализованных форм заболевания колеблются в диапазоне 60–70% для локализованных форм, но остаются неудовлетворительными (<25%) у пациентов с наличием метастатического поражения на момент постановки диагноза [8, 9]. По результатам объединенного анализа, около половины всех диагностированных пациентов с СЮ выживают согласно данным регистров США (SEER, Surveillance, Epidemiology, and End Results, 2014) и Европы (ACCIS, Automated Childhood Cancer Information System, 2007) [5, 8]. Анализ долгосрочных показателей выживаемости пациентов РБ показал, что уровень БСВ и ОВ как в общей когорте пациентов (49,5% и 49,7%), так и при локализованных формах, оцененных отдельно (64,5% и 64,8%), сопоставим со стандартами стран с развитой системой здравоохранения. Необходимо учитывать, что централизация диагностических и лечебных мероприятий в одном высокоспециализированном учреждении позволяет увеличить вероятность благоприятных исходов для всех педиатрических пациентов страны с данной патологией.

Таким образом, можно констатировать, что современные планы терапии достигли максимальной токсичности, но не могут превысить определенного уровня эффективности. В связи с этим поиск новых технологий диагностики и лечения, вероятно, связанных с опухолевыми биомаркерами, необходим сегодня для раннего определения пациентов, которые будут резистентными к терапии и разовьют рецидив болезни в ближайшее время от начала лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Долгосрочные показатели выживаемости педиатрических пациентов с СЮ в Республике Беларусь соответствуют стандартам стран с развитой системой здравоохранения. Метастатические формы заболевания требуют дальнейшего поиска терапевтических подходов. Новые маркеры необходимы для раннего прогнозирования той трети пациентов с локализованными формами болезни, которые окажутся резистентными к стандартным схемам лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aleinikova O., Potapnev M., Syckevich O., Petrovich S., Ismail-zade R., Strongin Y. (2000) Dostizhenia detskoy onkologii i hematologii v respublike Belarus' [Achievements for Pediatric Oncology and Hematology in the Republic of Belarus]. *Aktualnye voprosy detskoy onkologii i hematologii: Materialy VIII mejdunarodnogo simpoziuma*. Minsk, pp. 3–8.
2. Sukonko O., Antonenkova N. (2011) Organizazionno-metodicheskaja pomoshh', okazivaemaya gosudarstvennym uchrezhdeniem RNPC OMR im. N.N. Aleksandrova organizacijam zdavoohranenija v Respublike Belarus' [Organizational and methodological assistance provided by a public institution RSPC OMR named Centre of MPAs them. N.N. Alexandrova health organizations in the Republic of Belarus]. *Onkologicheskij zhurnal*, vol. 20, pp. 42–45.
3. Demidchik Yu., Pisarenko A., Fridman M., Baragina Z., Man'kovskaya S., Papok V. (2008) Neoperiruemyj rak shhitovidnoj zhelezy: e'ffektivnost' diagnostiki i vyzhivaemost' [Thyroid cancer: diagnostic performance and survival]. *Onkologicheskij zhurnal*, vol. 8, pp. 9–21.
4. Javrid E., Antonenkova N., Prohorova V., Lappo S. (2011) Rol molekuliarnych chasov v patogeneze i terapii zlokachestvennyh novoobrazovaniy' [Role of molecular hours in pathogenesis and therapy of malignant tumors]. *Medicinskaya panorama*, vol. 7, pp. 19–23.
5. Smith M.A., Altekruse S.F., Adamson P.C., Reaman G.H., Seibel N.L. (2014) Declining childhood and adolescent cancer mortality. *Cancer*, 120, pp. 2497–506.
6. Cotterill S.J., Ahrens S., Paulussen M., Jurgens H.F., Voute P.A., Gadner H. (2000) Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J. Clin. Oncol.*, 18, pp. 3108–3114.
7. Rodriguez-Galindo C., Navid F., Liu T., Billups C.A., Rao B.N., Krasin M.J. (2008) Prognostic factors for local and distant control in Ewing sarcoma family of tumors. *Ann. Oncol.*, 19, pp. 814–820.
8. Arndt V., Lacour B., Steliarova-Foucher E., Spix C., Znaor A., Pastore G. (2007) Up-to-date monitoring of childhood cancer long-term survival in Europe: tumours of the sympathetic nervous system, retinoblastoma, renal and bone tumours, and soft tissue sarcomas. *Ann Oncol.*, 18, pp. 1722–33.
9. Applebaum M.A., Worch J., Matthay K.K., Goldsby R., Neuhaus J., West D.C., Dubois S.G. (2011) Clinical features and outcomes in patients with extraskeletal Ewing sarcoma. *Cancer*, 117 (13), pp. 3027–32.
10. Petrovich S., Aleinikova O., Shumikhina T. (2002) Epidemiological aspects of childhood onco-hematological morbidity in the Republic of Belarus. *Vopr Onkol.*, 48 (3), pp. 301–305.
11. Paulussen M., Craft A.W., Lewis I., Hackshaw A., Douglas C., Dunst J. (2008) Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment-- cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients. *J Clin Oncol.*, 26, pp. 4385–93.
12. Granowetter L., Womer R., Devidas M., Krailo M., Wang C., Bernstein M. (2009) Dose-intensified compared with standard chemotherapy for nonmetastatic Ewing sarcoma family of tumours: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol.*, 27, pp. 2536–41.
13. Oberlin O., Rey A., Desfachelles A.S., Philip T., Plantaz D., Schmitt C. (2006) Impact of high-dose busulfan plus melphalan as consolidation in metastatic Ewing tumours: a study by the Societe Francaise des Cancers de l'Enfant. *J Clin Oncol.*, 24, pp. 3997–4002.
14. Juergens C., Weston C., Lewis I., Whelan J., Paulussen M., Oberlin O. (2006) Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumours in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr Blood Cancer*, 47, pp. 22–29.
15. Neerav S., Joshua D., Schiffman D. R., Davis I.J., Womer R.B., Lessnick S.L., Lawlor E.R. and The COG Ewing Sarcoma Biology Committee (2013) Biomarkers in Ewing sarcoma: the promise and challenge of personalized medicine. A report from the Children's Oncology Group. *Frontiers in oncology*, 3, pp. 1–13.

Поступила/Received: 06.03.2017

Контакты/Contacts: leonslight@mail.ru, aleinikova2004@mail.ru

Киселёв Л.П., Савицкая Т.В., Алейникова О.В.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Kisialeu L., Savitskaia T., Aleinikova O.

Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Маркеры ангиогенеза и антиангиогенная терапия у пациентов с локализованными формами саркомы Юинга

Angiogenesis markers and antiangiogenic therapy
for patients with localized Ewing's sarcoma

Резюме

При локализованных формах опухолей семейства саркомы Юинга (СЮ) рецидив развивается более чем у трети пациентов. Прогнозирование таких случаев возможно посредством понимания биологии процесса формирования опухолевой сосудистой сети – ангиогенеза (АГ). Ранее мы установили, что уровень маркеров АГ (экспрессии мРНК гена TFPI2 (ингибитор путей тканевого фактора) и соотношения изоформ фактора роста сосудов VEGFA165/VEGFA189) в ткани опухоли перед началом лечения позволяют прогнозировать клинический исход заболевания у пациентов с СЮ.

В представленном исследовании уровни маркеров АГ определялись в проспективном режиме, и для пациентов с неблагоприятным прогнозом стандартный терапевтический план был интенсифицирован посредством использования препарата бевацизумаб (ингибитор VEGF). В исследование включено 49 пациентов детского возраста с локализованными формами СЮ. Показана возможность определения около половины локализованных форм СЮ в группу благоприятного прогноза на основании уровня маркеров АГ. Констатировано, что применение антиангиогенной терапии позволяет уменьшить количество рецидивов (КЧР 27,7% vs 72,7%) в группе с прогнозируемым неблагоприятным исходом.

Ключевые слова: саркома Юинга, прогностические маркеры, ангиогенез, диагностика и лечение.

Abstract

About one-third of patients with localized Ewing's sarcoma (ES) develop relapse during or immediately after standard treatment. Previously we have established the ability to predict poor outcome based on mRNA expression levels of both TFPI2 (tissue factor pathway inhibitor 2) and VEGFA165/VEGFA189 (vascular endothelial growth factor isoforms) ratio in pretreatment tumor tissue. In this study, the level of angiogenesis (AG) markers was determined in prospective mode. VEGF-blockade strategy (through bevacizumab) was used to enhance the therapeutic effects for patients with poor prognosis. 49 patients with localized forms ES included in the study. About half of localized ES have a favorable

prognosis based on AG markers. Application of anti-angiogenic therapy can reduce the amount of relapses (KCR 27.7% vs 72.7%) in the group with predicted poor outcome.

Keywords: angiogenesis, pediatric patients with Ewing's sarcoma, diagnosis and management, prognostic markers.

ВВЕДЕНИЕ

Саркома Юинга (СЮ) – вторая по частоте встречаемости опухоль костной ткани у детей. Мягкотканый источник возникновения составляет 25–30% случаев. Все эти саркомы являются высокоагрессивными новообразованиями с высоким потенциалом развития и метастазирования [1–4]. Стандартный план системной химиотерапии малоэффективен для большинства метастатических и трети локализованных форм новообразований [5–6]. Пол, возраст, размер опухоли, уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ), центральная локализация характеризуются широким диапазоном параметров, и степень их влияния на клинический исход часто пересматривается. В современных базовых клинических протоколах все пациенты с локализованными формами СЮ получают индукционную химиотерапию по идентичным планам, независимо от перечисленных выше критериев [7–8]. Понимание биологии неопластического процесса предоставляет возможность прогнозирования пациентов с неблагоприятным исходом заболевания перед началом системной терапии. Ангиогенез (АГ) – процесс формирования опухолью собственной сосудистой сети, является условием развития и распространения новообразования [9–10]. Ранее мы установили, что уровень маркеров АГ (экспрессии мРНК гена TFPI2 (ингибитор путей тканевого фактора) и соотношения изоформ фактора роста сосудов VEGFA165/VEGFA189) в ткани опухоли перед началом лечения позволяет дифференцировать пациентов с локализованной СЮ на группы благоприятного и неблагоприятного исхода заболевания [11]. В представленном исследовании уровни маркеров АГ определялись в проспективном режиме, и для пациентов с неблагоприятным прогнозом стандартный терапевтический план был интенсифицирован посредством использования препарата бевацизумаб (ингибитор VEGF).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 49 пациентов с локализованными опухолями семейства саркомы Юинга, которые проходили диагностический комплекс и получали лечение в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (РНПЦ ДОГИ), Республика Беларусь [12]. Исследовался материал первичной опухоли, полученный в результате диагностического оперативного вмешательства (биопсии) до начала специального лечения. Пациенты, получавшие противоопухолевое лечение до взятия образца ткани были исключены из исследования. Критерием включения пациента в исследование было гистологическое, иммуногистохимическое и молекулярно-биологическое подтверждение диагноза.

В группу 1 (с 2004 по 2009 г.) включены 20 пациентов, для которых ретроспективно были изучены уровни экспрессии мРНК гена TFPI2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 и определена молекулярная комбинация неблагоприятного прогноза (МКНП) заболевания. В качестве МКНП нами ранее был определен уровень экспрессии мРНК гена TFPI2 $\leq 0,8$ и соотношение изоформ VEGFA165/VEGFA189 $\leq 1,0$ в ткани опухоли перед началом терапии [11]. В группу 2 (с 2011 по 2015 г.) включены 29 пациентов, которым уровни экспрессии мРНК гена TFPI2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 определялись в проспективном режиме

при инициальной постановке диагноза. При наличии МКНП стандартная терапия была усилена посредством назначения препарата бевацизумаб в дозе 7,5 мг/кг в день 1 каждого блока химиотерапии (n=15). Для пациентов с молекулярной комбинацией благоприятного прогноза терапия была стандартной.

Пациентам проводилось программное системное лечение и осуществлялся локальный контроль (операция, операция + лучевая терапия, только лучевая терапия). Режим химиотерапии группы 1 предусматривал использование винкристина, доксорубина, ифосфамида, циклофосфамида, этопозид, актиномицина D, бусульфана, мелфалана [11]. Режим химиотерапии группы 2 включал четырехкомпонентные блоки индукции (винкрестин, доксорубин, ифосфамид и этопозид) [13]; консолидирующая терапия была трехкомпонентной (винкрестин, ифосфамид, актиномицин D). Длительность бессобытийной выживаемости (БСВ), общей выживаемости (ОВ) и кумулятивной частоты рецидива (КЧР) исчислялась от времени постановки инициального диагноза. Образцы тканей были получены непосредственно во время операции, немедленно доставлены и заморожены в жидком азоте. Использовался гомогенизатор Retsch (XX, Германия). Для приготовления РНК и обратной транскриптазы – полимеразной цепной реакции в реальном времени (Реал-тайм ПЦР), тотальная РНК выделялась с использованием RNeasy Mini Kit (Qiagen, XX, Germany) согласно инструкции производителя. Количественные показатели концентрации РНК оценивались посредством спектрофотометрии. Тотальную РНК (1,5 мкг) из ткани конвертировали в первую цепь ДНК с использованием случайного праймера (0,3 мкг) и обратной транскриптазы 200 U мышиного вируса лейкемии (Moloney murine leukemia virus, M-MLV; Promega, XX, USA).

В оригинальных образцах были исследованы 3 гена: VEGFA165, VEGFA189 и TFPI-2. В качестве внутреннего контрольного гена использовалась глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH). Количественное определение генов осуществлялось посредством использования метода флуоресценции на основе реального времени (Taqman).

ПЦР в реальном времени для генов VEGFA и TFPI-2 проводилась с использованием коммерческих систем (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems, Foster City, CA, ID Hs00900054 мл и Hs00197918 мл соответственно). Праймеры и зонды для количественной оценки VEGF изоформ в ПЦР в реальном времени были использованы, как описано в публикации Gustafsson et al. [15]. Реакция проводилась в 20 мкл реакционной смеси с окончательным разведением 1× в (Taqman PCR universalmaster mix, Applied Biosystems) в соответствии с протоколом производителя и с помощью оборудования Icyler (Bio-Rad, Hercules, CA) в режиме реального времени. Относительные величины иРНК генов в образцах были рассчитаны по показателям стандартных кривых, полученных путем амплификации серийного разведения обратно транскрибированной тотальной РНК. Значения исследованных показателей были представлены в виде относительных величин.

Статистический анализ данных проводился с использованием программы R-statistics версия 3.2.0, R Foundation for Statistical Computing, лицензия GNU GPL. Оценка статистической значимости различий между сравниваемыми количественными показателями проводилась критерием U теста Манна – Уитни. Сравнение в группах по индивидуальным параметрам проводилось с помощью χ^2 теста. Для оценки выживаемости пациентов применялся метод Kaplan – Meier. Различия в выживаемости оценивались с использованием log-rank теста. Кумулятивная частота возникновения событий рассчитывалась методом конкурирующих рисков, различия кумулятивных частот оценивались с использованием теста Gray. Все различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспрессии мРНК генов TFPI-2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли в зависимости от клинического исхода заболевания пациентов группы 1 представлены на рис. 1.

Как представлено на рис. 1, у 8 из 9 (89%) пациентов группы, у которых развился ранний рецидив заболевания, значение уровня экспрессии мРНК гена TFPI-2 было менее 0,8. В то же время у тех же пациентов значение соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 было менее 1,0. Данная комбинация уровней экспрессии исследуемых онкомаркеров была обозначена как молекулярная комбинация неблагоприятного прогноза (МКНП). Также в выделенную зону были определены 3 пациента с локальными формами СЮ, находящиеся в длительной ремиссии. Не определился в локализованную зону только один пациент с ранним рецидивом заболевания, у которого были установлены максимальные уровни как экспрессии TFPI-2, так и соотношения VEGFA165/VEGFA189. Остальные пациенты локализовались вне выделенной условной зоны, ограниченной на основании определенных значений. В данную группу вошли 8 из 11 (73%) пациентов с длительной ремиссией и 1 из 9 (11%) пациентов с рецидивом.

Пятилетняя БСВ всей когорты пациентов группы 1 составила 55,3%, ОВ – 60,1%. Далее мы определили долгосрочные показатели выживаемости у пациентов в зависимости от распределения в группы благоприятного и неблагоприятного исхода заболевания на основании установленной МКНП. БСВ пациентов группы 1 и МКБП составила 89,4%, в то время как у пациентов с МКНП она была 27,2% ($P < 0,05$). Пятилетняя ОВ пациентов с локализованными формами СЮ и МКБП составила 89,4%, в то время как у пациентов с МКНП она была 36,3% ($P < 0,05$). Более подробная информация о пациентах группы 1 представлена в публикации [11].

Пациентам группы 2 уровень экспрессии мРНК генов TFPI-2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли определялся в проспективном режиме при инициальной диагностике.

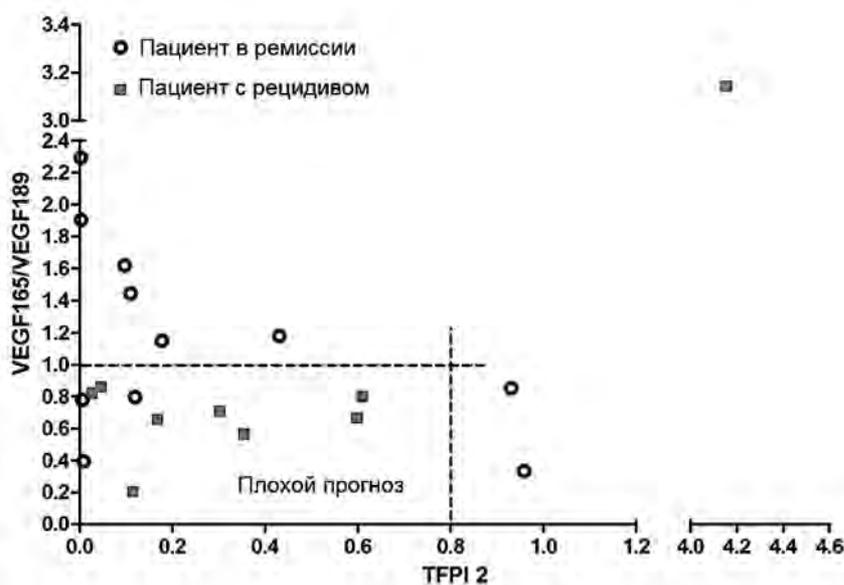


Рис. 1. Экспрессия мРНК гена TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 у пациентов группы 1 в зависимости от клинического исхода заболевания

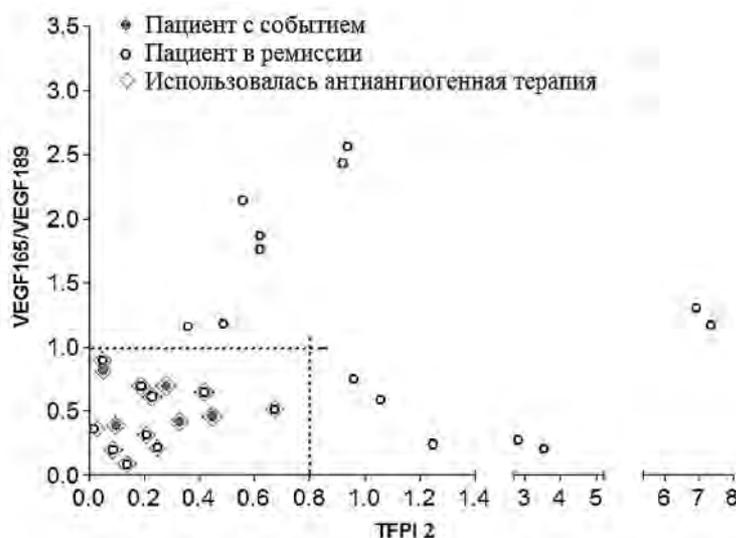


Рис. 2. Экспрессия мРНК гена TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 у пациентов группы 2 в зависимости от клинического исхода заболевания

Результаты экспрессии мРНК генов TFPI-2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли проспективной группы пациентов с локализованными формами СЮ представлена на рис. 2.

Как представлено на рис. 2, 14 из 29 (48,2%) пациентов были локализованы вне области МКНП; у них констатирован благоприятный исход заболевания (все пациенты живы без событий) после проведения стандартной системной терапии. Перед началом системной терапии 15 из 29 (51,8%) пациентов были локализованы в область МКНП; для них лечение было интенсифицировано посредством использования антиангиогенной терапии. Отрицательные события и неблагоприятный исход заболевания (4 рецидива, 1 токсическая смерть) констатированы только у пациентов, локализованных в область МКНП. На момент анализа 1 пациент с рецидивом жив и находится во второй ремиссии.

Проведено сравнение показателей КЧР пациентов группы 1 с прогнозируемым неблагоприятным исходом заболевания и без использования антиангиогенной терапии и пациентов группы 2 с прогнозируемым неблагоприятным исходом и с использованием антиангиогенной терапии.

Показатели КЧР пациентов в сравниваемых группах за 5-летний период наблюдения представлены на рис. 3.

Как представлено на рис. 3, КЧР пациентов с МКНП, но без использования антиангиогенной терапии (группа 1) за 5-летний период наблюдения составила 72,7%. У пациентов с МКНП и с использованием антиангиогенной терапии (группа 2) она была 27,7% ($P < 0,05$).

Была оценена экспрессия мРНК генов TFPI-2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 в объединенной когорте (группа 1 и группа 2) пациентов с локализованными формами СЮ.

Результаты экспрессии мРНК генов TFPI-2 и соотношения VEGFA165/VEGFA189 в объединенной когорте (группа 1 и группа 2) пациентов с локализованными формами СЮ представлены на рис. 4.

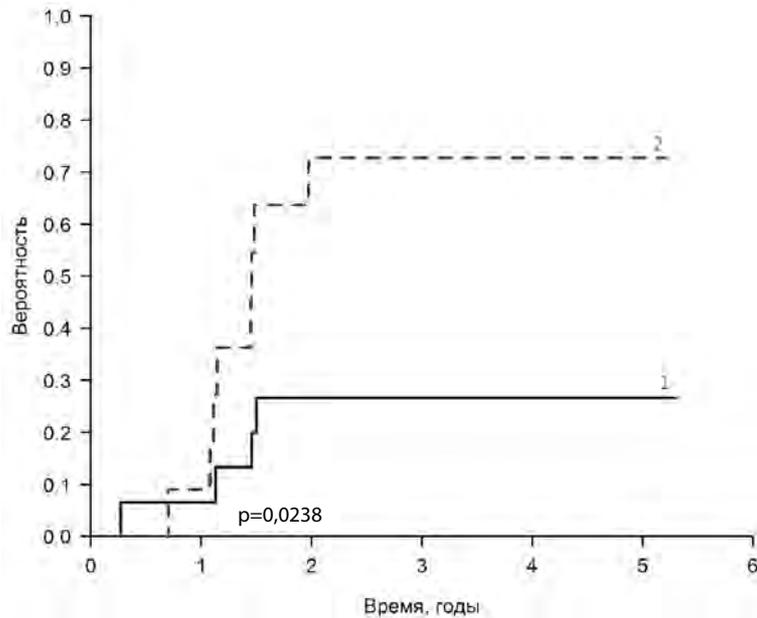


Рис. 3. КЧР пациентов с неблагоприятным прогнозом заболевания в зависимости от использования антиангиогенной терапии. 1 – пациенты с МКНП и с использованием антиангиогенной терапии: n=15, 4 рецидива (26,7±11,9%). 2 – пациенты с МКНП, но без использования антиангиогенной терапии: n=11, 8 рецидивов (72,7±14,9%)

Как представлено на рис. 4, уровень экспрессии мРНК генов TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 в ткани опухоли были оценены у 49 пациентов с локализованными формами опухолей семейства СЮ: 20 пациентов группы 1, 29 пациентов группы 2 с назначением антиангиогенной терапии при прогнозировании неблагоприятного клинического исхода. В когорту с благоприятным исходом заболевания, определенным на основании уровня

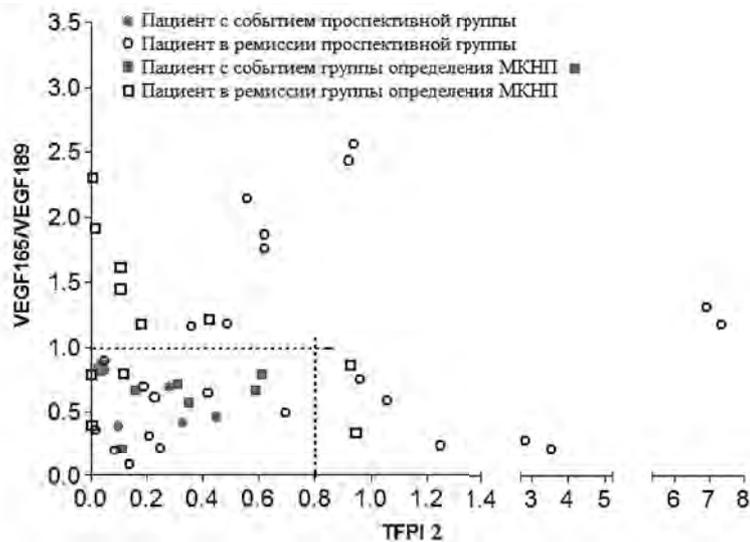


Рис. 4. Экспрессия мРНК гена TFPI-2 и соотношения изоформ VEGFA165/VEGFA189 у пациентов группы 1 и группы 2 в зависимости от клинического исхода заболевания

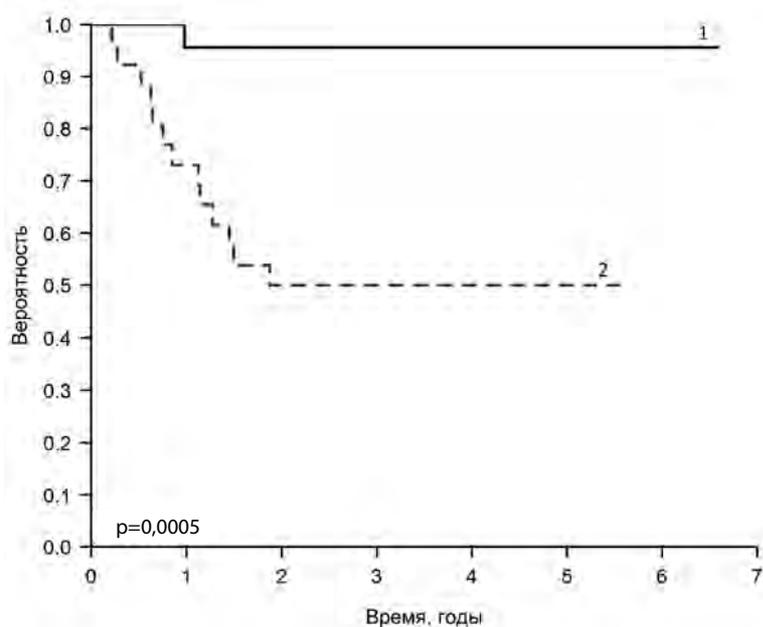


Рис. 5. БСВ пациентов объединенной когорты в зависимости от наличия МКНП. 1 – пациенты без МКНП: n=23, 22 без события (95,7±4,3%); 2 – пациенты с МКНП: n=26, 13 без события (50,0±9,8%)

экспрессии маркеров ангиогенеза, вошло 23/49 (46,9%) пациентов (9 – из группы 1, 14 – из группы 2). Когорту с неблагоприятным исходом заболевания, локализованных в область МКНП, составили 26/49 (53,1%): 11 – из группы 1, 15 – из группы 2.

Показатели БСВ, ОВ и КЧР были определены для всех пациентов с локализованными формами опухолей семейства СЮ и известным уровнем маркеров ангиогенеза.

Показатели БСВ объединенной когорты (группа 1 и группа 2) пациентов с локализованными формами опухолей семейства СЮ в зависимости от наличия молекулярной комбинации благоприятного или неблагоприятного исхода представлены на рис. 5.

Как представлено на рис. 5, показатель 5-летней БСВ всех пациентов исследования с локализованными формами СЮ без наличия МКНП составил 95,7%, у пациентов с наличием МКНП он был 50,0% ($P < 0,05$).

Показатели ОВ объединенной когорты пациентов с локализованными формами опухолей семейства СЮ (все пациенты, у которых были определены маркеры ангиогенеза в ткани опухоли при инициальной диагностике) в зависимости от наличия молекулярной комбинации благоприятного или неблагоприятного исхода представлены на рис. 6.

Как представлено на рис. 6, показатель 5-летней ОВ всех пациентов исследования с локализованными формами СЮ без наличия МКНП составил 95,7%, у пациентов с наличием МКНП он был 55,9% ($P < 0,05$).

Как представлено на рис. 7, показатель КЧР за 5-летний период наблюдения всех пациентов исследования с локализованными формами СЮ без наличия МКНП составил 4,35%, у пациентов с наличием МКНП он был 46,2% ($P < 0,05$).

Таким образом, представленная работа сообщает о возможности персональной интенсификации терапии пациентам с локализованными формами СЮ.

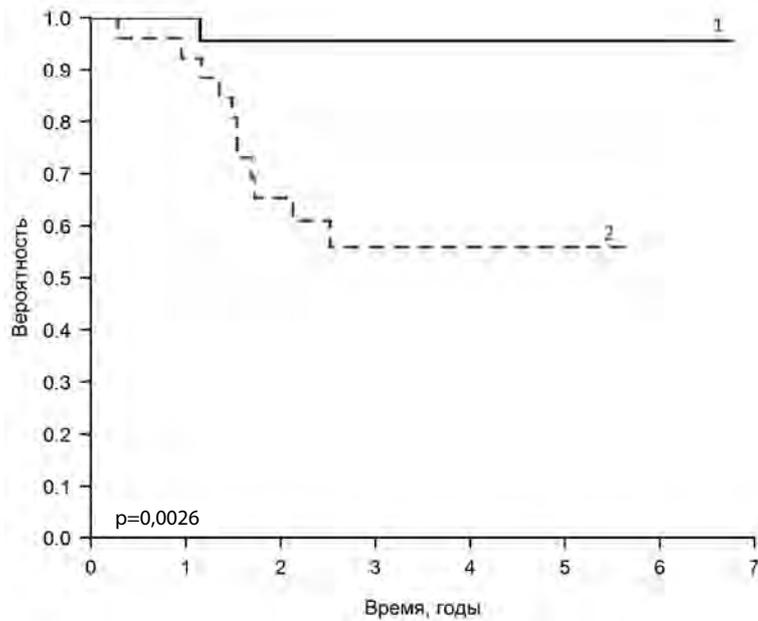


Рис. 6. ОВ пациентов объединенной когорты в зависимости от наличия МКНП. 1 – пациенты без МКНП: $n=23$, 22 живы ($95,7\pm 4,3\%$); 2 – пациенты с МКНП: $n=26$, 15 живы ($55,9\pm 10,1\%$)

Известно, что 30–40% пациентов с локализованными формами СЮ имеют химиорезистентность новообразования и развивают ранний рецидив заболевания. Ранее мы определили маркеры ангиогенеза, которые позволяют на этапе инициальной диагностики прогнозировать случаи с неблагоприятным ответом опухоли на системную терапию [11]. В настоящем исследовании представлены

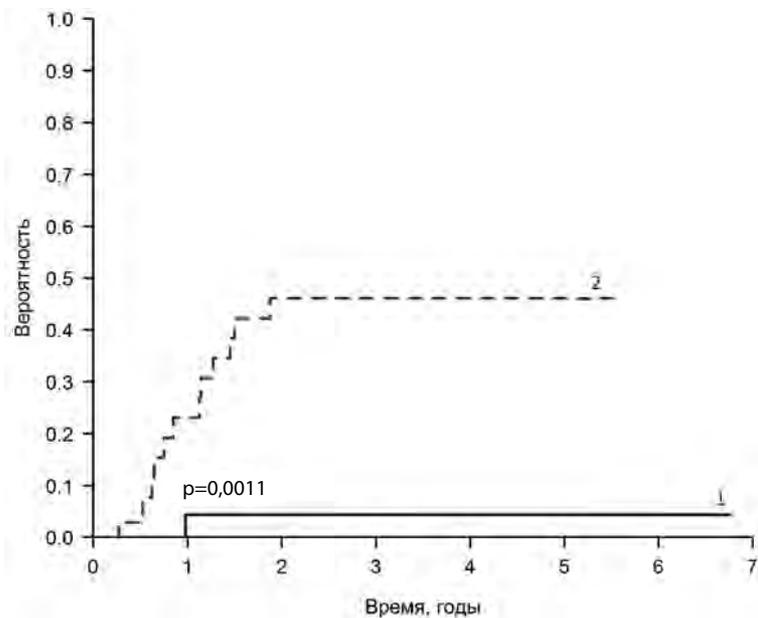


Рис. 7. КЧР пациентов объединенной когорты в зависимости от наличия МКНП. 1 – пациенты без МКНП: $n=23$, 1 рецидив ($4,35\pm 4,35\%$); 2 – пациенты с МКНП: $n=26$, 12 рецидивов ($46,2\pm 10,1\%$)

результаты использования этого теста в проспективном режиме, а также проведен анализ результатов использования VEGF-блокады для пациентов с неблагоприятным (на основании уровня маркеров ангиогенеза) прогнозом заболевания.

Целевые (таргетные) агенты, ингибирующие рост опухолевых сосудов, используются при широком спектре онкологических нозологий для усиления антинеопластического воздействия [16–18]. Что касается СЮ, североамериканские исследователи из Children's Oncology Group (COG) впервые использовали метрономную антиангиогенную терапию: винбластин и целекоксиб совместно с базовой схемой [16, 17]. В настоящий момент в Европейском Союзе и Соединенных Штатах Америки проводятся несколько исследований эффективности блокады АГ при СЮ [17, 18]. В одном из них (с 2007 г.) американские исследователи предложили использовать бевацизумаб в режиме рандомизации вместе со стандартной химиотерапевтической схемой для пациентов, рефрактерных к индукционной полихимиотерапии (№ протокола NCT00516295) [17, 18]. Кооперативная мультицентровая студия, в 2008 г. стартовавшая в странах Западной Европы (Франция, Нидерланды, Италия, Великобритания), также основной своей целью заявляет оценку эффективности применения ингибитора роста сосудов опухоли – бевацизумаба, но уже в первую линию лечения, для детей от 2 до 17 лет с первично-метастатическими формами СЮ (номер протокола NCT00643565) [17, 18]. В нашем исследовании бевацизумаб дополнил стандартную цитостатическую терапию пациентам с локализованными формами СЮ, у которых был спрогнозирован высокий риск возврата заболевания на основании уровней маркеров ангиогенеза в опухолевой ткани перед началом лечения. В группе с неблагоприятным прогнозом и использованием антиангиогенной терапии количество рецидивов было значительно меньше (КЧР=27,7%), чем у пациентов без использования блокады ангиогенеза (КЧР=72,7%).

Примерно для половины пациентов с локализованной СЮ на основании уровня экспрессии маркеров АГ прогнозируется благоприятный исход заболевания (5-летняя выживаемость 95,7%).

Таким образом, продемонстрировано, что антиангиогенная терапия может быть эффективна при персональном назначении пациентам с прогнозируемым (на основании уровня маркеров АГ в ткани опухоли) неблагоприятным исходом заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровни экспрессии маркеров АГ в ткани опухоли позволяют спрогнозировать благоприятный исход примерно для половины пациентов с локализованной СЮ.

Антиангиогенная терапия демонстрирует эффективность для пациентов с локализованными формами СЮ при прогнозируемом (на основании уровня маркеров АГ) неблагоприятном исходе заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aleinikova O., Potapnev M., Syckevich O., Petrovich S., Ismail-zade R., Strongin Y. (2000) Dostizhenia detskoy onkologii i hematologii v respublike Belarus' [Achievements for Pediatric Oncology and Hematology in the Republic of Belarus]. *Aktualnye voprosy detskoy onkologii i hematologii: Materialy VIII mejdunarodnogo simpoziuma*. Minsk, pp. 3–8.
2. Sukonko O., Antonenkova Nat. (2011) Organizazionno-metodicheskaja pomoshh', okazivaemaya gosudarstvennym uchrezhdeniem RNPC OMR im. N.N. Aleksandrova organizacijam zdavoohranenia v Respublike Belarus' [Organizational and methodological assistance provided by a public institution RSPC OMR named Centre of MPAs them. N.N. Alexandrova health organizations in the Republic of Belarus]. *Onkologicheskij zhurnal*, vol. 20, pp. 42–45.

3. Demidchik Yu., Pisarenko A., Fridman M., Baragina Z., Man'kovskaya S., Papok V. (2008) Neoperiruemyj rak shhitovidnoj zhelezy: e'ffektivnost' diagnostiki i vyzhivaemost' [Thyroid cancer: diagnostic performance and survival]. *Onkologicheskij zhurnal*, vol. 8, pp. 9–21.
4. Javid E., Antonenkova N., Prohorova V., Lappo S. (2011) Rol molekuliarnych chasov v patogeneze i terapii zlokachestvennyh novoobrazovaniy' [Role of molecular hours in pathogenesis and therapy of malignant tumors]. *Medicinskaya panorama*, vol. 7, pp. 19–23.
5. Padhhye B., McCowage G. (2011) Chemotherapy regimens in newly diagnosed and recurrent Ewing sarcoma in children and young adults. *CancerForum*, pp. 128–134.
6. Granowetter L., Womer R., Devidas M., Krailo M., Wang C., Bernstein M. (2009) Dose-intensified compared with standard chemotherapy for nonmetastatic Ewing sarcoma family of tumours: a Children's Oncology Group study. *J Clin Oncol.*, vol. 27, pp. 2536–41.
7. Bhavna Padhhye and Geoffrey McCowage (2010) Chemotherapy regimens in newly diagnosed and recurrent ewing sarcoma in children and young adults. *CancerForum*, vol. 34, no 3, pp. 34: 3.
8. Paulussen M., Craft A.W., Lewis I., Hackshaw A., Douglas C., Dunst J. (2008) Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment – cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients. *J Clin Oncol.*, vol. 26, pp. 4385–93.
9. Scotlandi K., Remondini D., Castellani G., Manara M.C., Nardi F., Cantiani L. (2009) Overcoming resistance to conventional drugs in Ewing sarcoma and identification of molecular predictors of outcome. *J Clin Oncol.*, vol. 27, pp. 2209–2216.
10. Ordenez J.L., Osuna D., Herrero D., De A' lava E., Madoz-G' J. urpide (2009) Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead? *Cancer Research*, vol. 69, no 18, pp. 7140–7150.
11. Kiselyov L.P., Savitskaya T.V., Lipai N.V., Aleinikova O.V. (2016) TFPI2, VEGFA165 i VEGFA189 kak nezavisimie faktori prognoza lokalizovannih form sarkomi Yuinga []. *Onkologicheskii zhurnal*, vol. 10, pp. 93–100.
12. Petrovich S., Aleinikova O., Shumikhina T. (2002) Epidemiological aspects of childhood onco-hematological morbidity in the Republic of Belarus. *Vopr Onkol.*, vol. 48, no 3, pp. 301–305.
13. Juergens C., Weston C., Lewis I., Whelan J., Paulussen M., Oberlin O. (2006) Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumours in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr Blood Cancer*, vol. 47, pp. 22–29.
14. Reddy K., Cao Y., Zhou Z., Yu L., Jia S.F., Kleinerman E.S. (2008) VEGF165 expression in the tumor microenvironment influences the differentiation of bone marrow-derived pericytes that contribute to the Ewing's sarcoma vasculature. *Angiogenesis*, vol. 11, pp. 257–267.
15. Schaefer K.L., Eisenacher M., Braun Y., Brachwitz K., Wai D.H., Dirksen U. (2008) Microarray analysis of Ewing's sarcoma family of tumours reveals characteristic gene expression signatures associated with metastasis and resistance to chemotherapy. *Eur J Cancer*, vol. 44, pp. 699–709.
16. Glade Bender J.L., Adamson P.C., Reid J.M., Xu L., Baruchel S., Shaked Y. (2008) Phase I trial and pharmacokinetic study of bevacizumab in pediatric patients with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no 3, pp. 399–405.
17. Subbiah V., Anderson P., Lazar A., Burdett E., Raymond K., Ludwig J. (2009) Ewing's sarcoma: standard and experimental treatment options. *Current Treatment Options in Oncology*, vol. 10 (1–2), pp. 126–140.
18. DuBois S., Marina N., Glade-Bender J. (2010) Angiogenesis and Vascular Targeting in Ewing Sarcoma. *Cancer*, vol. 1, pp. 749–757.

Поступила/Received: 06.03.2017

Контакты/Contacts: leonslight@mail.ru

УДК 616-006.66

Грибач С.М.^{1,2}, Чехун В.Ф.¹, Полищук Л.З.¹

¹ Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

² Киевский областной онкологический диспансер, Киев, Украина

Gribac S.^{1,2}, Chekhun V.¹, Polishchuk L.¹

¹ Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

² Kyiv Regional Oncology Center, Kyiv, Ukraine

Сравнительный анализ клинико-морфологических и молекулярно-биологических особенностей рака молочной железы у женщин разных возрастных периодов

Comparative analysis of clinical, morphological
and molecular biological features of breast cancer in women
of different age periods

Резюме

Цель: провести сравнительное исследование клинических, гистологических, молекулярно-биологических особенностей РМЖ I–III стадий в зависимости от возрастной категории пациентов. **Материалы и методы:** результаты клинического обследования 86 пациентов пожилого и старческого возраста (60–81 год) – основная группа, 116 пациентов молодого и среднего возраста (32–59 лет) – контрольная группа. Применены клинический, гистологический, иммуногистохимический, статистический методы исследования. **Результаты.** Сравнительно с контрольной группой у пациентов основной группы в 3 раза чаще диагностируется РМЖ III стадии, размеры первичных опухолей >2,5 см (57,0%), большее количество пациентов (18,6% против 9,5%) с пораженными метастазами регионарными лимфатическими узлами, инфильтративный протоковый РМЖ (51,2%), преимущество люминального А молекулярного подтипа (55,8%) и меньшая частота базальноподобного молекулярного подтипа (14,0%), большее количество опухолей с умеренным и низким уровнем экспрессии маркера пролиферации Ki-67.

Выводы. Установленная гетерогенность клинических, гистологических, молекулярно-биологических характеристик РМЖ у женщин пожилого и старческого возраста, который диктует необходимость дальнейшего исследования значения указанных характеристик опухолей в клиническом течении опухолевого процесса в этой категории пациентов.

Ключевые слова: рак молочной железы, возраст пациентов, клинические особенности, молекулярные подтипы.

Abstract

Aim: to undertake a comparative study of clinical, histological, molecular - biological features of BC I are the III stages depending on the age category of patients. **Object and methods:** results of clinical inspection 86 patients of elderly and senile age (60–81) is a basic group, 116 patients of young and middle age (32–59) is a control group. The clinical is applied, histological statistical research methods. **Results.** Comparatively with a control group for the patients of basic group BC of the III stage is diagnosed in 3 times more often, sizes of primary tumours >2,5 cm (57,0%), greater amount of patients (18,6% against 9,5%) with the staggered metastases by regional lymph nodes, infiltration ductal BC (51,2%), advantage of luminal A of molecular subtype (55,8%) of and less frequency of basal-like of molecular subtype (14,0%), greater amount of tumours with the moderate and subzero level of expression of marker of proliferation of Ki-67. **Conclusions.** Set heterogeneity of clinical, histological, molecular-biological descriptions of BC for the women of elderly and senile age that dictates the necessity of further research of value of the indicated descriptions of tumours for the clinical flow of tumour process at this category of patients.

Keywords: breast cancer, age of sick, clinical features, molecular subtype.

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости женщин во всем мире. По данным Национального канцер-регистра, в Украине ежегодно выявляется свыше 13 тысяч пациенток с РМЖ, что составляет 67,3 случая на 100 тысяч женского населения. Удельный вес заболеваемости РМЖ в Украине составляет 22,8%, но она неодинакова у женщин разного возраста. Так, в возрастном интервале 30–54 года она увеличивается к 27,2%, а после 55 лет – уменьшается до 19,8%. Смертность среди женщин этих возрастных групп от РМЖ также разная и составляет 11,0 и 77,0 случаев на 100 тысяч женского населения соответственно, при этом пик смертности от РМЖ наблюдается в возрасте 75–79 лет – 79 на 100 тысяч женского населения [1].

По классификации ВОЗ 2012 г. [2], выделяют следующие возрастные периоды: молодой возраст (25–44 года), средний возраст (45–59 лет), пожилой возраст (60–75 лет), старческий возраст (76–90 лет) и долгожители (после 90 лет). На сегодняшний день демографические изменения в современном обществе проявляются ростом средней продолжительности жизни и увеличением количества женщин пожилого возраста. Данные Государственной службы статистики Украины (2009–2017 гг.) по общей характеристике демографического состава населения Украины свидетельствуют, что на 1 января 2015 г. демографическая пропорция возрастных групп населения Украины изменилась следующим образом: с 2014 г. увеличивается часть женщин в возрасте от 40–44 лет до 100 и больше лет (от 51,5% к 72,9% соответственно) сравнительно с количеством мужчин (от 49,3% к 27,1% соответственно). На начало 2015 г. каждая пятая женщина находилась в возрасте 65 лет и старше. Учитывая указанные демографические изменения в Украине, а также высокие показатели заболеваемости и смертности онкологических больных, по данным Национального канцер-реестра Украины, проблема заболеваемости женщин пожилого возраста РМЖ становится все более актуальной. Это подчеркивается тем фактом, что этиопатогенез и факторы риска РМЖ в период менопаузы, а также биологические особенности опухолей у женщин пожилого и старческого возраста остаются окончательно неопределенными, невзирая на значительное количество исследований, посвященных неоплазиям молочной железы.

Известно, что результаты лечения пациентов с РМЖ и прогноз зависят как от ранней диагностики, так и от биологических особенностей опухолей [3, 4]. Для оценки последних используются многие молекулярно-биологические показатели, в частности, рецепторы к эстрогенам (ЕР) и прогестерону (ПР), эпидермальный фактор роста (HER-2), ген-супрессор роста TP53, маркер пролиферации Ki-67, активность ангиогенеза и другие. Как свидетельствуют данные литературы [5, 6], РМЖ характеризуется значительной гетерогенностью экспрессии указанных маркеров, но во многих исследованиях не акцентируется внимание на клинико-биологических особенностях РМЖ у женщин пожилого возраста. Между тем исследования этих вопросов являются весьма актуальными, потому что изучение связи клинических и молекулярно-биологических показателей РМЖ с возрастом пациентов позволит установить критерии злокачественности клинического течения опухолевого процесса у пациенток пожилого возраста. В свою очередь это будет способствовать корректной оценке индивидуального прогноза РМЖ [7, 8], что важно для разработки подходов для персонализированного лечения пациентов.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести сравнительное исследование клинических, гистологических, молекулярно-биологических особенностей РМЖ в зависимости от возрастной категории пациентов и оценить их клиническое значение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили результаты комплексного клинического обследования 202 пациенток с РМЖ I–III стадий, которые находились на стационарном лечении в Коммунальном заведении Киевского областного совета «Киевский областной онкологический диспансер» с 2009 по 2015 г. Все пациентки были информированы и дали согласие на включение их в исследование и использование полученных результатов в научных целях.

По классификации ВОЗ [2], все обследованные пациенты были разделены на две группы: основная – 86 женщин пожилого и старческого возраста (60–81 год) и контрольная группа – 116 женщин молодого и среднего возраста (32–59 лет). Средний возраст пациенток основной группы составлял $72 \pm 5,6$ года, контрольной группы – $52 \pm 8,4$ года.

Пациентам проводили физикальное обследование, применяли инструментальные методы, направленные на уточнение распространения опухолевого процесса: ультразвуковое обследование молочных желез и цифровая маммография, рентгенография органов грудной полости, ультрасонография органов брюшной полости, малого таза. До операционного лечения клинический диагноз верифицировали на основании гистологического исследования биопсии трепана опухолей молочной железы. Все клинические обследования проводили согласно стандартам диагностики пациентов с РМЖ, принятым в Украине. Всем пациенткам проводилось комплексное лечение: оперативное лечение, лучевая терапия, полихимиотерапия. У пациенток пожилого возраста были выполнены следующие операции: квадрантэктомия с лимфодиссекцией у 16 пациенток, мастэктомия по Маддену – у 50, мастэктомия по Пейти – у 20. У пациенток молодого возраста: квадрантэктомия с лимфодиссекцией – у 36 женщин, мастэктомия по Маддену – у 65, мастэктомия по Пейти – у 15.

Стадию опухолевого процесса в молочной железе оценивали по классификации TNM 7-го пересмотра [9]. Операционный материал (удаленные опухоли и регионарные

лимфоузлы) после фиксации в 10%-ном растворе нейтрального забуференного формалина подлежал гистологическому исследованию патоморфологом КЗ КОР «КООД» (зав. патогистологическим отделением Н.В. Марченко). При гистологическом исследовании оценивали гистологическую характеристику опухолей, степень дифференцирования, состояние регионарных лимфатических узлов (наличие или отсутствие метастазов). Иммуногистохимическое исследование включало определение экспрессии рецепторов стероидных гормонов (эстрогенов, прогестерона), эпидермального фактора роста HER-2/neu и маркера пролиферации (экспрессия Ki-67 в опухолевых клетках) с применением моноклональных антител производства фирмы Dako Cytomation (Denmark) к рецепторам эстрогена и прогестерона – клоны 1D5 и клоны 636 (поликлональный) соответственно, к HER-2/neu – поликлональные клоны CB11, к протеину Ki-67 – MIB-1. Результаты реакции экспрессии эстрогенов и прогестерона оценивались следующим образом: 0–10% – негативная, 11–33% – слабо позитивная, 34–100% – выраженная позитивная экспрессия. Для HER-2/neu реакция считалась позитивной при условии «3+», если экспрессия белка оказывалась в более чем 30% клеток; при позитивной реакции «2+» оказывалось менее 30% положительно окрашенных клеток; при отсутствии расцветки реакция считалась негативной. Для Ki-67: отсутствие окрашенных клеток – негативная реакция; до 20% окрашенных клеток – незначительной пролиферации, 21–40% – умеренная пролиферация; >40% – высокая пролиферация опухолевых клеток. Иммуногистохимическое исследование проводилось в патогистологическом отделении (зав. патогистологическим отделением д.м.н. Л.М. Захарцева) Киевского городского клинического онкологического центра. Согласно результатам иммуногистохимического исследования определялся молекулярный подтип удаленных опухолей молочной железы по классификации [10]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0. Отличия показателей между отдельными группами пациентов оценивали с помощью критерия Стьюдента. Достоверными считали значения при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение обследованных пациентов по стадиям опухолевого процесса согласно классификации TNM приведено в табл. 1. Из таблицы видно, что количество пациентов с РМЖ основной группы, у которых диагностирована I стадия, было наименьшим (1,2%), тогда как в контрольной группе количество таких пациентов было больше (11,2%). Количество пациенток с РМЖ II стадии в основной и контрольной группах составило 69,8% и 79,3% соответственно. РМЖ III стадии диагностировался чаще у пациенток основной группы (29%), чем в контрольной группе (9,5%) ($p > 0,05$).

Следовательно, у пациенток основной группы диагностируется в основном РМЖ II стадии (69,8%) и РМЖ III стадии (29,0%), при этом частота РМЖ III стадии

Таблица 1
Распределение пациенток по стадиям опухолевого процесса

Стадия РМЖ по классификации TNM	Количество пациентов	
	Основная группа, 86/100%	Контрольная группа, 116/100%
I ($T_{1-2}N_0M_0$)	1 (1,2)	13 (11,2)
II ($T_{1-2}N_1M_0$; $T_3N_0M_0$)	60 (69,8)	92 (79,3)
III ($T_{3-4}N_{1-3}M_0$)	25 (29,0)*	11 (9,5)

Примечание: * $p < 0,05$ сравнительно с показателями двух групп.

в 3 раза больше, чем в контрольной группе (9,5%, $p < 0,05$). Такое распределение пациентов по стадиям опухолевого процесса свидетельствует о достоверном увеличении количества пациенток с РМЖ III стадии в основной группе по сравнению с контрольной группой, что может указывать на несвоевременное обращение к онкологу пациентов в пожилом и старческом возрасте.

Известно, что течение опухолевого процесса зависит от многих факторов, одним из которых является размер опухоли. По данным литературы [11, 12], существует корреляция между размером опухоли и наличием гематогенных метастазов: при диаметре опухоли до 1 см гематогенные метастазы определяются у 2,3% пациентов, а при размере 2,5 см и более их частота увеличивается в 6 раз.

Сравнительный анализ клинических и морфологических особенностей РМЖ у пациенток основной и контрольной групп представлен в табл. 2.

Как свидетельствуют приведенные данные, количество пациентов основной группы с размерами опухолей до 1 см было незначительным и составило 2,3%, что достоверно меньше, чем среди пациентов контрольной группы (5,2%, $p < 0,05$). Размеры опухоли от 1 до 2,5 см выявлены соответственно в 40,7% и 50,8% у пациентов основной и контрольной групп ($p < 0,05$), то есть они также были больше у пациентов контрольной группы. Однако наибольшие по размерам опухоли (больше 2,5 см в диаметре) отмечались чаще у пациенток основной группы (57,0%), чем в контрольной группе (44,0%, $p < 0,05$). Полученные данные совпадают с исследованиями других авторов [3, 6], которые также указывают, что у пациентов с РМЖ размер опухоли коррелирует с возрастом.

Полученные результаты указывают на преобладание у пациентов с РМЖ в возрасте от 60 до 84 лет больших по размеру опухолей, большее количество пораженных метастазами регионарных лимфатических узлов, что может свидетельствовать о более агрессивном течении заболевания. Это совпадает с данными других исследователей, которые также указывают на значение размера опухолей и частоты поражения метастазами регионарных лимфатических узлов в клиническом течении РМЖ [15, 16].

Таблица 2
Клинико-морфологическая характеристика РМЖ у пациенток основной и контрольной групп

Показатели	Пациенты с РМЖ	
	Основная группа (60–84 года) n=86 (100%)	Контрольная группа (35–59 лет) n=116 (100%)
Размер опухоли, диаметр		
≤1 см	2 (2,3)	6 (5,2)*
1–2,5 см	35 (40,7)	59 (50,8)*
>2,5 см	49 (57,0)*	51 (44,0)
Метастазы в регионарные лимфатические узлы		
Отсутствие метастазов в лимфатические узлы	27(31,4)	48(41,4)
Метастатическое поражение лимфатических узлов	59 (68,6)*	68 (58,6)
В том числе:		
Метастазы в 1–4 регионарные лимфатические узлы	43(50,0)	57(49,1)
Метастазы в 5–8 регионарные лимфатические узлы	16(18,6)*	11(9,5)
Гистологический тип РМЖ		
Инфильтративный протоковый рак	44 (51,2)*	52 (44,8)
Инфильтративный дольковый рак	26 (30,2)	39 (33,6)
Другие гистологические типы рака	16 (18,6)	25 (21,6)

Примечание: * $p < 0,05$ между показателями двух групп.

Одной из важнейших клинических характеристик опухолевого процесса и показателем его клинической прогрессии является наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах, потому что с увеличением количества лимфатических узлов, пораженных метастазами, уменьшается безрецидивная и общая выживаемость пациентов [7, 11]. Анализ клинических данных установил (табл. 2), что метастазы в регионарные лимфатические узлы выявлены у 68,6% пациентов основной группы, что достоверно больше, чем у пациентов контрольной группы (58,6%, $p < 0,05$). Более детальный анализ количества пораженных метастазами регионарных лимфатических узлов показал, что поражение 1–4 лимфатических узлов наблюдалось одинаково часто в обеих группах пациентов – у 50% пациентов основной группы и у 49,1% пациентов контрольной группы ($p > 0,05$), тогда как поражение 5–8 лимфатических узлов было достоверно больше у пациентов основной группы (18,6%) по сравнению с контрольной (9,5%, $p < 0,05$). Можно допустить, что большее количество пораженных метастазами регионарных лимфатических узлов у пациентов основной группы связано с большей агрессивностью опухолевого процесса, на что указывают и другие авторы [13, 14].

Известно, что ход и прогноз злокачественного процесса РМЖ также зависит от гистологического типа опухоли. Данные литературы свидетельствуют, что инвазивный дольковый РМЖ реже метастазирует по сравнению с инвазивным протоковым РМЖ, а медуллярный РМЖ имеет более благоприятный прогноз в сравнении с инвазивным протоковым РМЖ [15, 16]. Однако следует отметить, что однозначного ответа о преобладании того или другого гистологического типа РМЖ у пациентов в разных возрастных группах нет [17].

Анализ гистологического типа РМЖ показал, что инфильтративный протоковый рак достоверно чаще диагностировался у пациентов основной группы (51,2%), чем у пациентов контрольной группы (44,8%, $p < 0,05$). Частота инфильтративного долькового рака была одинаковой у пациентов основной и контрольной групп и составляла 30,2% и 33,6% соответственно ($p > 0,05$). Частота других гистологических типов РМЖ также не имела достоверных отличий (18,6% и 21,6%, $p > 0,05$) (табл. 2). Таким образом, по гистологической структуре РМЖ у пациентов основной группы является гетерогенным с количественным преимуществом инфильтративного протокового РМЖ.

Согласно классификации Perou С.М. и Sorlie Т. [10], злокачественные эпителиальные опухоли молочной железы по молекулярно-биологическим характеристикам делятся на отдельные подтипы. Опухоли с люминальным подтипом А имеют позитивный рецепторный статус стероидных гормонов (ЭР+, ПР+) и негативный HER-2/neu статус. По данным исследований [19], при этой форме рака наблюдается более благоприятное течение и прогноз болезни. Люминальный подтип В характеризуется позитивным HER-2/neu статусом и любым значением рецепторного статуса, но прогноз при нем менее благоприятен. Базальноподобный подтип или трижды рецептор-негативный рак характеризуется негативным рецепторным статусом (РЭ-, РП-) и отсутствием экспрессии эпидермального фактора роста HER-2/neu и является наиболее клинически неблагоприятным вариантом РМЖ относительно прогноза общей и безрецидивной выживаемости [20]. По данным литературы [21, 22], у женщин пожилого возраста диагностируют РМЖ разных молекулярных подтипов, но их частота и зависимость от особенностей опухолевого процесса окончательно не определены.

Результаты проведенного нами сравнительного количественного распределения пациентов в зависимости от молекулярных подтипов РМЖ в основной и контрольной группах представлены в табл. 3. Как свидетельствуют приведенные данные, у пациентов основной и контрольной групп были выявлены разные молекулярные

Таблица 3
Молекулярные подтипы РМЖ и их частота у пациентов основной и контрольной групп

Группы пациентов	Молекулярные подтипы РМЖ		
	Люминальный А ПР+, ЭР+, HER-2/neu- n (%)	Люминальный В ПР+, ЭР+, HER-2/neu+ n (%)	Базальноподобный ПР-, ЭР-, HER-2/neu- n (%)
Основная, n=86 (100%)	48 (55,8)*	26 (30,2)	12 (14,0)
Контрольная, n=116 (100%)	42 (36,2)	46 (39,6)*	28 (24,2)*

Примечание: * p<0,05 сравнительно с показателями двух групп.

подтипы РМЖ. У большинства пациентов пожилого возраста (основная группа) был люминальный А молекулярный подтип РМЖ (55,8%), тогда как количество пациентов с люминальным В молекулярным подтипом было значительно меньше – 30,2%. Базальноподобный молекулярный подтип РМЖ диагностирован только у 14% пациентов основной группы, у пациенток контрольной группы распределение опухолей было несколько иным: у них преобладал люминальный А молекулярный подтип (39,6%), что было достоверно выше чем среди пациентов основной группы (p<0,05). Частота базальноподобного молекулярного подтипа также была больше у пациенток контрольной группы и представляла 24,2% против 14,0% у пациентов основной группы (p<0,05). Следовательно, для пациентов основной группы характерным является преимущество люминального А молекулярного подтипа и меньшая частота базальноподобного молекулярного подтипа сравнительно с распределением частоты молекулярных подтипов у пациентов контрольной группы.

Пролиферативная активность неоплазий является одним из важнейших биологических свойств опухолей и определяет не только их темп роста, но и злокачественный потенциал. Экспрессия Ki-67 в опухолях разного генеза широко исследуется при изучении пролиферации опухолевых клеток, при этом экспрессия больше, чем у 30% опухолевых клеток, оценивается как неблагоприятный фактор течения заболевания. Большинство исследований указывают на ассоциацию между экспрессией Ki-67 и достоверностью рецидива опухоли после хирургического лечения: чем выше показатель Ki-67, тем выше достоверность рецидива [23, 24]. Между тем вопрос относительно зависимости экспрессии Ki-67 от возраста пациентов с РМЖ остается окончательно не решенным, хотя одиночные работы по этому поводу существуют [25].

Нами проведено иммуногистохимическое исследование экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в опухолях 89 пациентов с РМЖ: 38 пациентов – основная группа и 51 пациент – контрольная группа (табл. 4). В зависимости от количества

Таблица 4
Распределение пациентов с РМЖ разного возраста в зависимости от экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в опухолевых клетках

Группы пациентов в зависимости от экспрессии Ki-67 в опухолевых клетках	Пациенты пожилого и старческого возраста (основная группа) (38/100%)	Пациенты молодого и среднего возраста (контрольная группа) (51/100%)
РМЖ с низким уровнем пролиферации	9 (23,7)	11 (21,6)
РМЖ с умеренным уровнем пролиферации	24 (63,1)*	24 (47,0)
РМЖ с высоким уровнем пролиферации	5 (13,2)	16 (31,4)*

Примечание: * p<0,05 сравнительно с показателями двух групп.

опухолевых клеток, экспрессирующих Ki-67, были выделены следующие уровни пролиферации: низкий уровень пролиферации – количество экспрессирующих данный маркер клеток не превышает 20%, умеренный уровень пролиферации – количество экспрессирующих клеток от 20% к 40%, высокий уровень пролиферации – количество клеток с экспрессией Ki-67 превышает 40%.

При оценке уровня пролиферации в опухолях пациентов основной и контрольной групп нами установлено, что у 86,8% пациенток пожилого и старческого возраста преобладали опухоли с умеренным и низким уровнем пролиферации Ki-67 (соответственно 63,1% и 23,7%). Количество пациентов с аналогичным уровнем пролиферации опухолевых клеток было меньшим в группе пациенток молодого и среднего возраста (соответственно 47,0% и 21,6%). Количество пациентов с высоким уровнем пролиферации Ki-67 также было различным в двух группах, в частности в 2,4 раза больше у пациенток молодого и среднего возраста (31,4%), чем среди пациенток пожилого и старческого возраста (13,2%, $p < 0,05\%$). РМЖ у пациентов основной группы можно отнести к опухолям с низкой и умеренной экспрессией Ki-67 в опухолевых клетках. Между тем именно в этой группе пациентов наблюдалось больше по размерам первичных опухолей, большее количество пораженных метастазами лимфатических узлов, при этом преобладал инфильтративный протоковый рак и люминальный А молекулярный подтип.

В настоящее время общепринятой является мысль, что РМЖ имеет более агрессивное течение и менее благоприятный прогноз в молодом возрасте и относительно благоприятный у пациенток пожилого возраста. Вместе с тем проведенный анализ клинко-биологических особенностей РМЖ у женщин разного возраста не показал однозначных данных, а установил значительную гетерогенность показателей, которые характеризуют опухолевый процесс. На гетерогенность РМЖ у женщин в зависимости от разных вековых периодов указывают другие исследования. В одном из них [26] было проведено сравнение клинических и биологических характеристик опухолей у 432 пациенток с РМЖ и показана гетерогенность степени злокачественности, распространенности опухолевого процесса, экспрессии Ki-67, но не установлено достоверной разницы в частоте молекулярных подтипов рака.

Надо отметить, что причины такой гетерогенности достаточно разнообразны: это нарушение метаболизма ряда биохимических процессов, которые наблюдаются у людей пожилого возраста и гериатрические болезни, ассоциируемые с возрастом, хотя их влияние на склонность к развитию РМЖ не установлено. В целом, как свидетельствуют данные литературы, популяция женщин пожилого возраста является более гетерогенной, чем популяция женщин молодого возраста, не только по особенностям менопаузального периода, но и по преимуществам заболеваний разного генеза (болезни сердечно-сосудистой и дыхательной систем, желудочно-кишечного тракта и других), обусловленных возрастом [27, 28].

Если рассматривать проблему РМЖ в целом и гетерогенность характеристик РМЖ в частности, можно прийти к выводу об окончательно не установленных корреляциях клинических характеристик РМЖ с его морфологическими и молекулярно-биологическими особенностями у женщин пожилого и старческого возраста. В этом аспекте нельзя оставлять в стороне и общее положение организма в зависимости от возраста, в частности проявления метаболического синдрома, которому придается существенное значение в патогенезе развития опухолевой патологии в молочной железе, а также гериатрические болезни, связанные с возрастом. Необходимо отметить, что наличие ряда гериатрических болезней может стать серьезным препятствием для проведения радикального лечения у пациенток пожилого возраста, что побуждает к разработке новых методов терапии этой категории больных. Учитывая увеличение популяции этой категории женщин, все больше значения

приобретает разработка подходов для своевременной уточненной и углубленной диагностики опухолевых процессов в молочной железе, комплексное исследование опухолей с идентификацией индивидуальных клинических и биологических особенностей для разработки корректного лечения таких пациентов. С этой целью разрабатываются новые варианты лечения женщин пожилого возраста с РМЖ [29–31] с учетом гериатрических болезней, индивидуального состояния организма и биологических особенностей опухолей молочной железы.

ВЫВОДЫ

1. РМЖ у женщин пожилого и старческого возраста по сравнению с женщинами молодого и среднего возраста характеризуется следующими клиническими характеристиками: в 3 раза чаще диагностируется РМЖ III стадии, чаще наблюдаются большие размеры первичных опухолей (>2,5 см), большее количество пациенток (18,6% против 9,5%) с метастатическими поражениями регионарных лимфатических узлов.
2. У женщин пожилого и старческого возраста диагностируются разные морфологические варианты РМЖ с преобладанием инфильтративного протокового РМЖ (51,2% сравнительно с 44,8%, $p < 0,05$, у пациенток молодого и среднего возраста). Частота инфильтративного долькового рака одинакова у пациенток разного возраста.
3. Для женщин пожилого и старческого возраста с РМЖ характерно наличие преимущественно люминального А молекулярного подтипа (55,8%) и меньше по частоте встречаемости базальноподобного молекулярного подтипа (14,0%) сравнительно с распределением таких молекулярных подтипов у женщин молодого и среднего возраста.
4. У 86,8% пациенток пожилого и старческого возраста отмечена гетерогенность экспрессии Ki-67 с преобладанием опухолей умеренного и низкого уровня экспрессии Ki-67 (соответственно 63,1% и 23,7% опухолей).
5. Полученные результаты указывают на гетерогенность клинических, гистологических, молекулярно-биологических характеристик РМЖ у женщин пожилого возраста, что диктует необходимость дальнейших разработок относительно значения гетерогенности опухолей в ходе опухолевого процесса у данного контингента пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. (2016) *Rak v Ukraine. Byulleten' Natsional'nogo kantser-reestra Ukraini* [Bulletin of National cancer registry of Ukraine]. Kiev №18 3-12, 46 p.
2. www.who.int/countries/ukr/ru/
3. Bondar' G., Dumanskii Yu., Yakovets Yu., Skochilyas T., Sedakov I., Smirnov V. (2002) *Osobennosti morfologii i gormonal'nogo statusa raka molochnoi zhelezi v pozhilom vozraste* [Morphology and hormonal status of breast cancer in the elderly]. *Material nauchno-prakticheskoi konferentsii "Lecheniya onkologicheskikh bol'nih preklonnih let"* [The material of scientific-practical conference "treatment of cancer patients of advanced years"]. Kiev, 46 p.
4. Bondarenko I., El'hazhzh M., Prositeľ A., Zavizion V., Chebanov K. (2016) *Rak molochnoi zhelezi. Ot molekulyarnoi biologii k personifitsirovannoi terapii* [Breast cancer. From molecular biology to personalized therapy]. *Morphologia*, vol. 10, no 1, pp. 18–25.
5. O'Connor T., Shinde A., Doan C. (2013) *Managing breast cancer in the older patient. Clin Adv Hematol Oncol.*, vol. 11, no 6, pp. 341–347.

6. Puts M.T., Tu H.A., Tourangeau A. (2014) Factors influencing adherence to cancer treatment in older adults with cancer: a systematic review. *Ann Oncol.*, vol. 25, pp. 564–77
7. Sedakov I., Smirnov V., Polinchuk D., Skochilyas T. (2010) Znachenie prognosticheskikh faktorov opuholi v vibore taktiki lecheniya bol'nih rakom molochnoi zhelezi [The value of prognostic factors of tumor in the choice of tactics of treatment of patients with breast cancer]. *Novoobrazovanie. Nauchno-prakticheskii zhurnal Donetskogo oblastnogo protipuhlinogo tsentra*, vol. 5, pp. 56–61.
8. Wildiers H., Kunkler L., Biganzoli I. (2007) Management of breast cancer in elderly individuals: recommendations of the international Society of Geriatric Oncology. *The Lancet Oncology*, vol. 8, pp. 1101–1115.
9. Edge S.B., Byrd D.R., Carducci M.A. (2009) American Joint Committee on Cancer (AJCC). *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. New York: Springer.
10. Perou C.M., Perou C.M., Sorlie T. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, vol. 406, no 6797, pp. 747–52.
11. Bernstein V., Truong P., Speers C. (2001) Breast cancer biology, treatment, and survival in elderly women. *Proc. Amer. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 20, p. 247.
12. Petkau V., Bulavina I., Sakaeva D. (2012) Vozrastnie osobennosti raka molochnoi zhelezi [Age features of breast cancer]. *Onkologiya*, vol. 4, no 965, pp. 24–26.
13. Pinzar' V., Emel'yanov S., Nechushkin M., Uimanov V. (2006) Rak molochnoi zhelezi v pozhilih zhenshin. Sovremennoe sostoyanie problemi [Breast cancer in older women. Current state of the problem]. *Vestnik RONTs*, vol. 17, no 4, pp. 13–17.
14. Biganzoli L., Wildiers H., Oakman C. (2012) Management of elderly patients with breast cancer: updated recommendations of the International Society of Geriatric Oncology(SIOG) and European Society of Breast Cancer Specialists(EUSOMA). *Lancet Oncol*, vol. 13, no 4, pp. 148–160.
15. Schonberg M., Marcantonio E., Li D. (2010) Breast cancer among the oldest old: tumor characteristics, treatment choices, and survival. *J Clin Oncol.*, vol. 28, pp. 2038–45.
16. Dovzhenko S., Rassi H., Zahartseva L., Podol'skaya S., Myasoedov D., Gorovenko N. (2007) Nekotore faktori riska razvitiya raka molochnoi zhelezi i prognoza techeniya zabolevaniya u patsientok iz Ukraini [Some risk factors of breast cancer development and prognosis of the disease in patients from Ukraine]. *Vrachebnoe delo*, vol. 7, pp. 61–64.
17. Elmorani F., Zine M., Afif M. (2015) Management of early breast cancer in older women: from screening to treatment. *Breast Cancer*, vol. 7, pp. 165–171.
18. Yancik R., Wesley M.N., Ries L.A. (2001) Effect of age and comorbidity in postmenopausal breast cancer patients age 55 years and older. *JAMA*, vol. 285, no 7, pp. 885–892.
19. Bondar' G., Dumanskii Yu., Yakovets Yu., Skochilyas T., Sedakov I., Smirnov V. (2002) *Osobennosti morfologii i gormonal'nogo statusa raka molochnoi zhelezi v pozhilom vozraste* [Morphology and hormonal status of breast cancer in the elderly]. *Material nauchno-prakticheskoi konferentsii "Lecheniya onkologicheskikh bol'nih preklonnih let"* [The material of scientific-practical conference "treatment of cancer patients of advanced years"]. Kiev, 46 p.
20. Tesarova P. (2013) Breast cancer in the elderly – Should it be treated differently? *Rep Pract Oncol Radiother*, vol. 18, no 1, pp. 26–33.
21. Leonard R.C., Barrett-Lee P.J., Gosney M.A. (2010) Effect of patients age on management decisions in breast cancer: consensus from a national consultation. *The Oncologist*, vol. 15, pp. 657–654.
22. Markopoulos C., Van-de-Water W. (2012) Older patients with breast cancer: Is there bias in the treatment they receive? *Ther Adv Med Oncol.*, vol. 4, no 6, pp. 321–7.
23. Smith B., Jiang J., McLaughlin S. (2011) Improvement in breast cancer outcomes over time: Are older women missing Out? *J Clin Oncol.*, vol. 29, pp. 4647–53.
24. Kiderlen M., Ponti A., Mariano T. (2015) Variations in compliance to quality indicators by age for 41,871 breast cancer patients across Europe: a European society of breast cancer specialists database analysis. *Eur J Cancer*, vol. 51, pp. 1221–30.
25. Danese M., O'Malley C., Lindquist K. (2012) An observational study of the prevalence and incidence of comorbid conditions in older women with breastcancer. *Ann Oncol.*, vol. 23, no 7, pp. 1756–65.

26. Montroni I., Rocchi M., Santini D. (2014) Has breast cancer in the elderly remained the same over recent decades? A comparison of two groups of patients 70 years or older treated for breast cancer twenty years apart. *J Geriatric Oncol.*, vol. 5, no 3, pp. 260–265.
27. Petera J., Dušek L. (2013) Cancer in the elderly. *Rep Pract Oncol Radiother*, vol. 18, no 1, pp. 1–5.
28. Kazmierska J. (2013) Do we protect or discriminate? Representation of senior adults in clinical trials. *Rep Pract Oncol Radiother*, vol. 18, pp. 6–10.
29. Walton L., Ommen K., Audisio R.A. (2011) Breast reconstruction in elderly women breast cancer: A review. *Cancer Treat Rev.*, vol. 37, pp. 353–357.
30. In H., Jiang W., Lipsitz S.R. (2013) Variation in the utilization of reconstruction following mastectomy in elderly women. *Ann Surg Oncol.*, vol. 20, pp. 1872–1879.
31. Hamnett K.E., Subramanian A. (2016) Breast reconstruction in older patients: A literature review of the decision – making process. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.*, pp. 1325–1334.

Поступила/Received: 14.06.2017

Контакты/Contacts: sergadoc1975@ukr.net

Рукша К.Г.¹, Жерко И.Ю.², Неровня А.М.², Бич Т.А.², Тур Г.Е.³, Горгун Ю.В.⁴, Портянко А.С.²

¹ Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

³ Минский городской клинический онкологический диспансер, Минск, Беларусь

⁴ Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

Ruksha K.¹, Zherko I.², Nerovnya A.², Bich T.², Tur G.³, Gorgun J.⁴, Portyanko A.²

¹ N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk, Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

³ Minsk City Clinical Oncologic Dispensary, Minsk, Belarus

⁴ Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Закономерности экспрессии тканевой трансглутаминазы в колоректальном раке

Expression of tissue transglutaminase in colorectal cancer

Резюме

Целью данного исследования явилось определение закономерностей экспрессии тканевой трансглутаминазы (тТГ) в колоректальной аденокарциноме. Исследование проводилось на материале 125 аденокарцином, полученных от 124 пациентов. Нормализованный уровень экспрессии был получен морфометрическим анализом гистологических срезов, окрашенных иммуногистохимически с антителами к тТГ. Выявлено, что экспрессия фермента в строме опухоли статистически значимо повышается по сравнению с нормальной слизистой оболочкой. Более высокий уровень экспрессии тТГ в строме опухоли связан с меньшей вероятностью смерти от колоректального рака. Для пациентов I–II клинических стадий снижение уровня экспрессии фермента в строме центра, а для III–IV стадий – в раковых клетках центра опухоли, ассоциировано с более высоким риском прогрессирования заболевания.

Ключевые слова: колоректальный рак, тканевая трансглутаминаза, прогноз.

Abstract

The objective of the research was to determine the expression patterns of tissue transglutaminase (tTG) in colorectal cancer (CRC). The study was performed on surgical material of 125 adenocarcinomas from 124 patients. The expression level was assessed by morphometric analysis on histological slides stained by immunohistochemistry with antibodies to tTG. Increased tTG expression was observed in tumor tissue in comparison to normal colonic mucosa. Normalized level of tTG was significantly higher in the tumor stroma than in the cytoplasm of cancer cells both in the center and in the invasive front. High tTG expression in the stroma of the tumor center was associated with lower risk of tumor progression in patients with clinical stage I–II while better prognosis in stage III–IV was observed in patients with high level of tTG in the cytoplasm of cancer cells in the tumor center.

Keywords: colorectal cancer, tissue transglutaminase, prognosis.

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) на сегодняшний день является 4-й по частоте злокачественной опухолью, приводящей к смерти [1]. Несмотря на разрабатываемые схемы скрининга, как во всем мире, так и в Республике Беларусь, КРР зачастую выявляется на поздних стадиях с распространенным метастатическим поражением [2], что и составляет основную проблему в лечении пациентов. В связи с этим изучение механизмов прогрессии опухоли и ее предотвращение является задачей первостепенной важности для успешной борьбы с этим заболеванием.

Трансглутаминазы – широко распространенная группа ферментов, обеспечивающих формирование глутамил-лизиновых связей, в результате чего образуются высокомолекулярные белковые продукты, устойчивые к протеолитическому и механическому расщеплению. Второй тип – это тканевая трансглутаминаза (тТГ). Функционирование тТГ связывают с множеством биологических процессов, задействованных в росте и прогрессии опухолей, таких как пролиферация и дифференцировка клеток, стабилизация белков внеклеточного матрикса, развитие химиорезистентности опухолей [3]. Важными с точки зрения изучения опухолевого процесса являются еще две функции фермента: участие в апоптозе и обеспечение клеточной подвижности [4].

Тем не менее, опубликованные на сегодняшний день результаты разных опухолей достаточно противоречивы: описана роль тТГ как фермента, способствующего более агрессивному течению заболевания, так и препятствующего прогрессии [5–7].

В целом не вызывает сомнения факт возможной роли тТГ как «мишени» для регуляции опухолевого поведения.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение закономерностей экспрессии тТГ при колоректальном раке и установление роли данного фермента в прогнозе заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование экспрессии тТГ было проведено на фиксированном в формалине гистологическом операционном материале 125 колоректальных аденокарцином от 124 пациентов (55 мужчин и 69 женщин). Возраст на момент операции составил $64,6 \pm 11,1$ года. Все пациенты были прооперированы в учреждении здравоохранения «Минский городской клинический онкологический диспансер» (УЗ МГКОД) одним хирургом в период с ноября 2009 г. по апрель 2011 г. Клинико-морфологическая характеристика опухолей представлена в табл. 1. Срок динамического наблюдения за пациентами в среднем составил $2,9 \pm 0,15$ года, при этом максимальное время наблюдения – 5,5 года. Наблюдение проводилось в УЗ МГКОД в соответствии с национальными протоколами: повторные обследования планировались в первые два года после операции – 1 раз в 6 месяцев, затем – 1 раз в год, при отказе пациента явиться в установленные сроки обследование проводилось по мере того, как пациент обратится в медицинское учреждение.

Для исследования были отобраны гистологические блоки с участком наиболее глубокого инвазивного роста опухоли. В качестве группы сравнения была использована неопухолевая слизистая оболочка из краев резекции, либо взятая на расстоянии не менее 1 см от опухоли (50 случаев).

Таблица 1
Клинико-морфологическая характеристика опухолей

Признак	n=125
Локализация опухоли	
Слепая – поперечная кишка	32
Селезеночный изгиб – прямая кишка	93
Категория pT	
pT1–2	15
pT3–4	110
Вовлечение регионарных лимфоузлов	
pN0	59
pN1–2 (1–3 лимфоузла)	66
Вовлечение апикального лимфоузла	
Нет	85
Да	25
Не обнаружен	15
Синхронные отдаленные метастазы	
Нет	104
Да	21
Клиническая стадия	
I–II	56
III–IV	69
Гистологическая степень злокачественности	
G1	14
G2	78
G3	33

Гистологические срезы толщиной 4 мкм монтировались на предметные стекла, обработанные 3-аминопропилтриэтоксисилоном. Демаскировка антигенов проводилась 30 с в нагреваемой барокамере Pascal (Dako, Дания) в цитратном буфере (рН 6,0). В качестве первичных использовались моноклональные мышинные антитела к тТГ (клон СUB 7402, Abcam, Великобритания, 1:1000). Инкубация с коктейлем из первичных антител проводилась в холодильной камере при 4 °С в течение 18 ч. Детекция связавшихся антител производилась при помощи полимерной системы визуализации BioGenex Super Sensitive™ (SS) Polymer-HRP IHC Detection System (BioGenex, США). В качестве хромогена использовался диаминобензидин (Dako, Дания), в качестве контрокрашивания – гематоксилин Майера. При проведении отрицательного контрольного окрашивания исключалось первичное антитело к тТГ. В качестве положительного контроля использовали мышечную пластинку слизистой оболочки толстой кишки, обладающую заведомо интенсивным иммуногистохимическим окрашиванием.

Съемка производилась на микроскопе Leica DM5000 цифровой камерой Leica DFC420 C с применением объектива ×20. В гистологических препаратах КРР снималось по 3 случайных непересекающихся поля зрения из центральной зоны, и 3 непересекающихся последовательных поля зрения из инвазивного фронта каждой опухоли. Для 50 случаев были сделаны микрофотографии 3 непересекающихся последовательных полей зрения прилежащей неопухолевым слизистой оболочки. В каждом поле зрения автоматически выделялись и сегментировались два компартмента: эпителиальный и стромальный. В дальнейшем определялась интенсивность экспрессии тТГ по отношению к площади компартмента. Нормализованный уровень экспрессии (НУЭ) рассчитывался по формуле:

$$\text{НУЭ} = \frac{\text{Уровень экспрессии тТГ в компартменте}}{\text{Уровень экспрессии тТГ в положительном контроле}} \times 100$$

Статистический анализ производился с использованием пакета RStudio, v. 0.98.1103 (RStudio, Inc., США). Сравнение групп проводили при помощи двустороннего теста Манна – Уитни с поправкой Бонферрони (p_{mu}). Связь с опухолеспецифической и беспрогрессивной выживаемостью в группах оценивалась при помощи построения кривых Каплана – Майера и их сравнения лог-ранг тестом (p_{lr}). Отсекающее значение формирования групп для анализа выживаемости определяли при помощи веб-сервиса Cutoff Finder <http://molpath.charite.de/cutoff/index.jsp>. Определение связи между параметрами проводилось методом многофакторного линейного регрессионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При иммуногистохимическом окрашивании нормальной слизистой оболочки толстой кишки тТГ выявлялась лишь в гладкомышечных и эндотелиальных клетках и практически не выявлялась в колоноцитах. НУЭ тТГ в строме опухоли был повышен по сравнению с нормальной слизистой оболочкой ($p < 0,001$) (рис. 1, 2, табл. 2).

Значение НУЭ фермента 3,97 и ниже в строме центра опухоли было связано с более высоким риском смерти от КРП (рис. 3).

Повышение НУЭ тТГ выше 35,91 в раковых клетках и выше 3,97 в строме центра опухоли было ассоциировано с меньшей вероятностью опухолевой прогрессии (рис. 4).

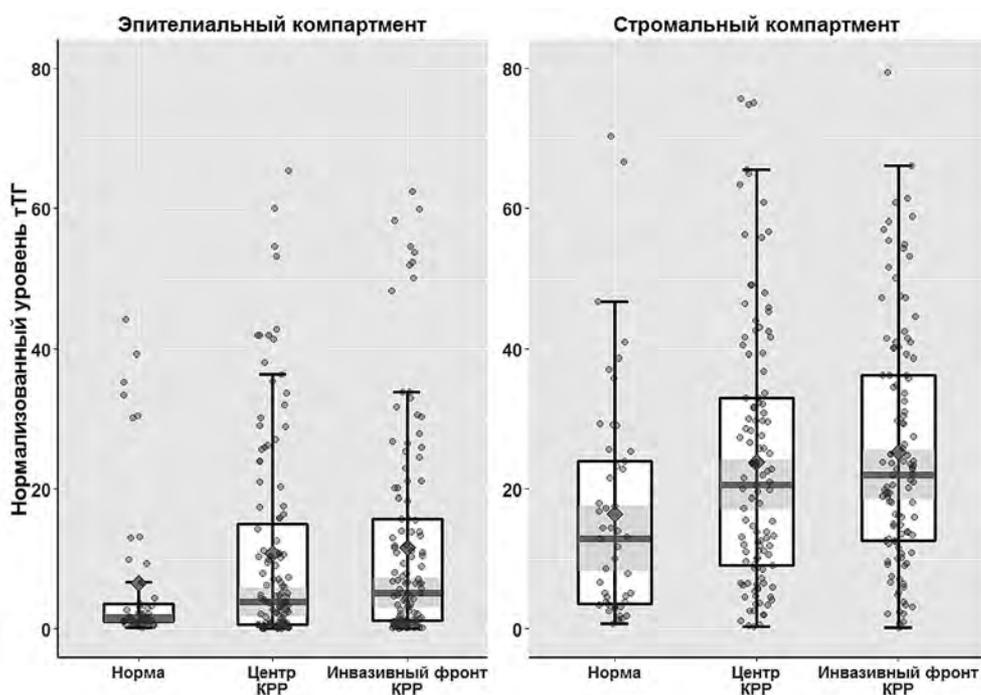


Рис. 1. НУЭ тТГ в нормальной слизистой оболочке толстой кишки, центре и инвазивном фронте КРП



Рис. 2. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к тТГ, $\times 200$. Хромоген – DAB, контрокрашивание гематоксилином Майера

Таблица 2
Значения p_{mu} при сравнении НУЭ тТГ в различных компартаментах КРР

		q1 Ме q3	Инвазивный фронт	
			Раковые клетки	Строма
Нормальная слизистая оболочка	Эпителий	1,0; 1,6; 3,6	0,107	0,000
	Строма	3,6; 12,9; 23,9	0,224	0,001
Центр опухоли	Раковые клетки	0,7; 4,1; 16,0	1,000	0,000
	Строма	9,7; 22,5; 40,4	0,000	1,000

Примечание:

q1 Ме q3: q1 – первый квартиль, Ме – медиана, q3 – третий квартиль.

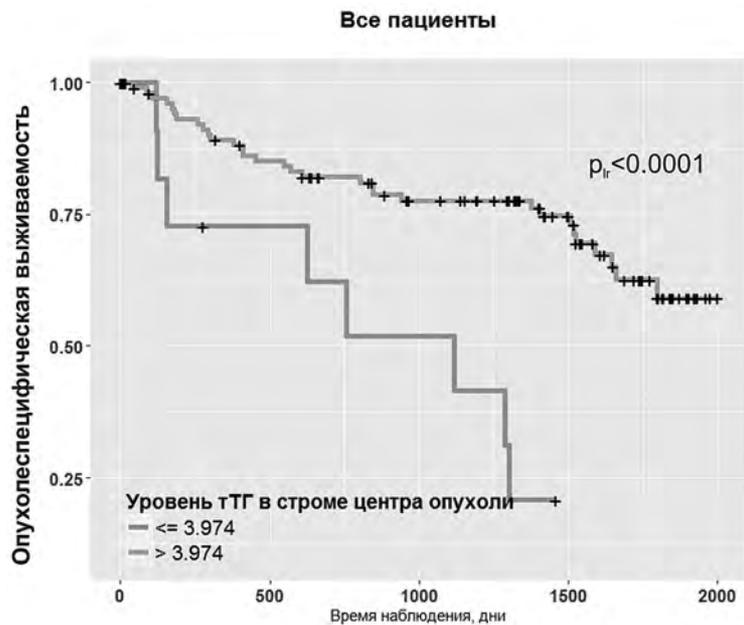


Рис. 3. Опухольспецифическая выживаемость пациентов с КРР в зависимости от НУЭ тТГ

Для пациентов с I–II клиническими стадиями КРР снижение уровня экспрессии фермента в строме центра опухоли, а для III–IV стадий – в раковых клетках центра опухоли ассоциировалось с более высоким риском прогрессирования заболевания.

Многофакторный линейный регрессионный анализ выявил, что снижение экспрессии тТГ в строме центра опухоли связано с большим размером опухоли ($p=0,010$ и $p=0,009$ для pT3 и pT4 соответственно). Большой уровень фермента в раковых клетках центра и инвазивного фронта опухоли ассоциировался с отсутствием полярности ядер ($p=0,001$ и $p<0,001$ для центра опухоли и инвазивного фронта соответственно) и с более высокой клинической стадией заболевания ($p=0,009$ и $p=0,007$ для II и III стадий соответственно).

Имеющиеся на сегодняшний день данные достаточно противоречивы и характеризуют тТГ как «контекст-зависимую» молекулу, функционирование которой зависит от преобладания определенных изоформ фермента, доступности ее белковых субстратов, а также от конкретной локализации внутри клетки. Например, тТГ, ассоциированная с $\beta 1$ -интегрином на мембране клетки, является корцептором для взаимодействия с молекулами внеклеточного матрикса и тем самым обуславливает большую подвижность клетки [5, 6], в то время как активированная тТГ в цитозоле, напротив, может ограничивать миграционную способность за счет трансминирования и «сшивок» ряда внутриклеточных белков [7]. В литературе упоминается факт внутри- и внеклеточного повышения содержания фермента при воздействии стрессовых факторов: перекисного окисления липидов, возрастания внутриклеточной концентрации кальция [5, 8]. В нашем исследовании отмечался повышенный уровень тТГ в опухолевой ткани, для которой характерно состояние гипоксии и свободнорадикального стресса [9, 10].

Нами было установлено, что снижение экспрессии тТГ в раковых клетках центра опухоли связано с большей вероятностью прогрессирования КРР, в особенности на III–IV стадиях, для которых характерно наличие метастазов в лимфатических узлах и отдаленных органах. В большинстве экспериментальных исследований на культурах, выделенных из рака молочной железы, нейробластомы, повышение экспрессии тТГ в опухолевых клетках ассоциируется с наличием отдаленных метастазов [11–13]. С другой стороны, в ряде исследований установлено, что в опухолевых клетках метастазов КРР иммуногистохимическая экспрессия тТГ падает по сравнению с первичной карциномой, а в экспериментах на клеточных культурах наблюдалось повышение инвазивной активности клеток КРР при «выключении» тТГ путем подавления специфичными малыми интерферирующими РНК [7, 14]. Таким образом,

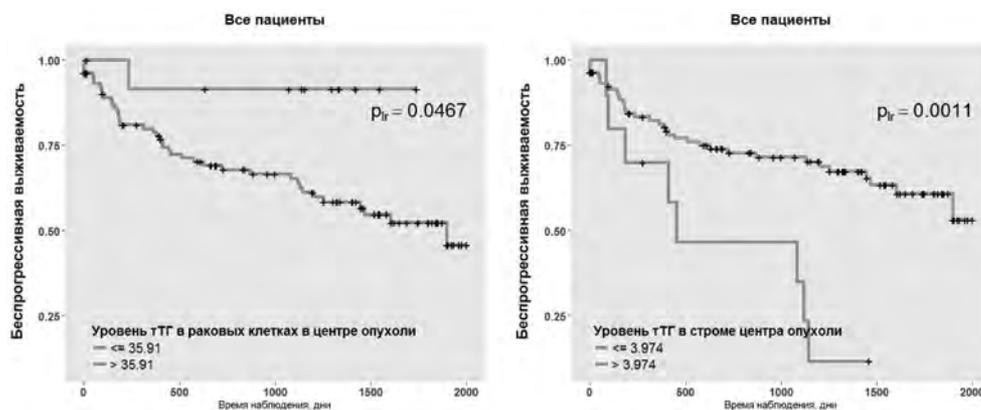


Рис. 4. Беспрогрессивная выживаемость пациентов с КРР в зависимости от НУЭ тТГ

снижение содержания тТГ в раковых клетках центра опухоли может быть связано с их большим метастатическим потенциалом и быть маркером неблагоприятного течения заболевания.

Одной из основных функций тТГ является необратимая «сшивка» белков, субстратами для чего могут быть фибронектин, ламинин, коллаген, остеоонектин внеклеточного матрикса [15, 16]. Доказано повышение экспрессии тТГ при хронических заболеваниях, сопровождающихся фиброзом в легких и почках, при атеросклерозе [17, 18], кроме того, модифицированный тТГ внеклеточный матрикс более устойчив к разрушению металлопротеазами [16]. В нашем исследовании было выявлено значительное повышение стромальной экспрессии тТГ как в центре, так и в инвазивном фронте КРР, причем больший уровень тТГ в строме центра опухоли был связан с лучшей опухолеспецифической выживаемостью и с меньшей вероятностью прогрессии заболевания, что в наибольшей степени было характерно для пациентов с I–II стадиями КРР. Кроме того, установленная связь повышения тТГ в строме центра опухоли с меньшим размером опухоли может быть связана с более медленным ростом за счет стабилизации стромы. Существует точка зрения о том, что повышение содержания тТГ в экстрацеллюлярном матриксе способствует прогрессии заболевания на ранних стадиях [8]. Тем не менее, полученные нами результаты согласуются с мнением многих исследователей, которые установили, что экспрессия и активность тТГ в строме способствует замедлению роста опухоли и препятствует метастазированию [14, 19, 20].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышенный уровень тТГ в раковых клетках, вероятно, препятствует инвазивной активности клеток. В строме опухоли тТГ выполняет функцию стабилизации экстрацеллюлярного матрикса путем формирования устойчивых к механическому и протеолитическому разрушению белковых структур, что препятствует росту опухоли и метастазированию. Более высокий уровень тТГ как в раковых клетках, так и в строме центра опухоли способствует менее агрессивному течению заболевания и является маркером благоприятного прогноза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bernard W. Stewart and Christopher P. Wild (ed.) (2014) *International Agency for Research on Cancer*, 2014; 953.
2. Sukonko O.G. (2011) Sostoyanie i perspektivi razvitiya onkologii v Respublike Belarus' [The state and prospects of development of Oncology in the Republic of Belarus]. *Onkologicheskii zhurnal*, vol. 4, pp. 5–18.
3. Li B, Cerione R.A., Antonyak M. (2011) Tissue transglutaminase and its role in human cancer progression. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, vol. 78, pp. 247–293.
4. Chhabra A., Verma A., Menta K. (2009) Tissue transglutaminase promotes or suppresses tumors depending on cell context. *Anticancer research*, vol. 29, pp. 1909–1920.
5. Priglinger S.G., Alge C.S., Neubauer A.S. (2004) TGF-beta2-induced cell surface tissue transglutaminase increases adhesion and migration of RPE cells on fibronectin through the gelatin-binding domain. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 45, pp. 955–963.
6. Mangala L.S., Fok J.Y., Zorilla-Calanca I.R. (2007) Tissue transglutaminase expression promotes cell attachment, invasion and survival in breast cancer cells. *Oncogene*, vol. 26, pp. 2459–2470.
7. Cellura D., Pickard K., Quarantino S. (2015) MiR-19-mediated inhibition of Transglutaminase-2 leads to enhanced invasion and metastasis in colorectal cancer. *Mol. Cancer Res.*, vol. 13(7), pp. 1095–1105.

8. Miyoshi N., Ishii H., Mimori K. (2010) TGM2 is a novel marker for prognosis and therapeutic target in colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 17, pp. 967–972.
9. Harris A.L. (2002) Hypoxia is a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Rev. Cancer.*, vol. 2, pp. 38–47.
10. Noman M.Z., Hasmim M., Messai Y. (2015) Hypoxia: a key player in antitumor immune response. A review in the theme: cellular responses to hypoxia. *American Journal of Physiology*, vol. 309, pp. 569–579.
11. Chen J., Kanopleva M., Multani A. (2004) Human breast cancer MCF-7 cells are paradoxically sensitive to apoptosis. *J. Cell Physiol.*, vol. 200, pp. 223–234.
12. Mehta K. (1994) High levels of transglutaminase expression in doxorubicin-resistant human breast carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, vol. 58, pp. 400–406.
13. Yuan L., Choi K., Khosla C. (2005) Tissue transglutaminase 2 inhibition promotes cell death and chemosensitivity in glioblastomas. *Mol. Cancer Therap.*, vol. 4, pp. 1293–1302
14. Zirvi K.A., Keogh J.P., Slomiany A. (1991) Transglutaminase activity in human colorectal carcinomas of differing metastatic potential. *Cancer Lett.*, vol. 60, pp. 85–92.
15. Paulsson M., Aeschlimann D. (1991) Cross-linking of laminin-nidogen complexes by tissue transglutaminase. A novel mechanism for basement membrane stabilization. *J. Biol. Chem.*, vol. 266, pp. 15308–15317.
16. Kleman J.P., Aeschlimann D., Paulsson M. (1995) Transglutaminase-catalyzed cross-linking of fibrils of collagen V/XI in A204 rhabdomyosarcoma cells. *Biochemistry*, vol. 34, pp. 13768–13775.
17. Griffin M., Smith L.L., Wynne J. (1979) Changes in transglutaminase activity in an experimental model of pulmonary fibrosis induced by paraquat. *Br. J. Exp. Pathol.*, vol. 60, pp. 653–661.
18. Johnson T.S., Griffin M., Thomas G.L. (1997) The role of transglutaminase in the rat subtotal nephrectomy model of renal fibrosis. *J. Clin. Invest.*, vol. 99, pp. 2950–2960.
19. Haroon Z.A., Lai T.S., Hettash J.M. (1999) Tissue transglutaminase is expressed as a host response to tumor invasion and inhibits tumor growth. *Lab. Invest.*, vol. 79, pp. 1679–1686.
20. Mangala L.S., Arun B., Sahin A.A. (2005) Tissue transglutaminase-induced alterations in extracellular matrix inhibit tumor invasion. *Mol. Cancer*, vol. 4, p. 33.

Поступила/Received: 04.04.2017

Контакты/Contacts: julia.gorgun@mail.ru

УДК 616-006.0

Шляхтунов Е.А., Веремей И.С.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь

Shlyakhtunou Y., Veremeyi I.

Vitebsk State Order of People Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

Экспрессия генетических маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и маркера стволовой клетки в циркулирующих опухолевых клетках при первичном неметастатическом раке молочной железы

Expression of genetic markers of epithelium-mesenchimal transition and stem cell marker in circulating tumor cells in primary nonmetastatic breast cancer

Резюме

Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), которые предположительно являются активным источником метастатического распространения при первичном раке молочной железы (РМЖ), могут нести фенотип стволовых клеток. Кроме того, для реализации процесса метастазирования ЦОК должны пройти феномен эпителиально-мезенхимального перехода (EMT). В данном исследовании была изучена экспрессия трех маркеров EMT и маркера стволовых клеток ALDH1 в ЦОК у 102 пациенток с первичным неметастатическим РМЖ.

Цель. Изучить экспрессию генетических маркеров эпителиально-мезенхимального перехода Twist, PI3Ka, Akt2 и маркера опухолевой стволовой клетки ALDH1 в ЦОК при первичном неметастатическом РМЖ.

Материалы и методы. Были проанализированы образцы периферической крови от 102 женщин, страдающих первичным неметастатическим РМЖ. Обогащение и выделение ЦОК проводилось с использованием технологии ковалентно-связанных антител для CD326 с последующей изоляцией ЦОК по размеру. Выделение мРНК и синтез к ДНК проводились с использованием соответствующих наборов (ООО «СИВитал», Беларусь). Для анализа EMT и наличия маркера стволовых клеток РМЖ использовали набор AdnaTest EMT-1/StemCell (Adna Gen AG, Langenhagen, Germany).

Результаты. Общая частота обнаружения ЦОК составила 67,6%. 51 женщина из 69 (74%) была положительной по меньшей мере для одного из маркеров EMT, а 32 из 69 пациенток (46,4%) были положительными для ALDH1. В группе ЦОК положительных образцов показатели экспрессии маркеров EMT составляли 3% (TWIST), 70% (Akt2) и 52% (PI3Ka).

Выводы. Совершенствование поиска и функциональной оценки остаточных ЦОК со свойствами самообновления стволовых клеток в сочетании с традиционной химиотерапией может обеспечить конкретный подход к предотвращению рецидива рака и улучшить долгосрочную выживаемость.

Ключевые слова: рак молочной железы, ЦОК, стволовая клетка, эпителиально-мезенхимальный переход.

Abstract

Circulating tumor cells (CTCs), which are thought to be an active source of metastatic spread in primary breast cancer (BC), can carry the phenotype of stem cells. In addition, for the implementation of the metastasis process, CTCs must undergo the phenomenon of epithelial-mesenchymal transition (EMT). In this study, the expression of three EMT markers and the ALDH1 stem cell marker in the CTCs in 102 patients with primary nonmetastatic breast cancer was studied.

The aim is to study the expression of the genetic markers of the epithelial-mesenchymal transition Twist, PI3Ka, Akt2 and the marker of the tumor stem cell ALDH1 in the CTCs for primary nonmetastatic breast cancer.

Materials and methods. Peripheral blood samples from 102 women with primary non-metastatic breast cancer were analyzed. Enrichment and isolation of the CTC was performed using covalently-coupled antibody technology for CD326 followed by isolation of the CTCs in size. Isolation of mRNA and synthesis to cDNA was performed using appropriate kits (SIVital, Belarus). An EMT-1 / StemCell AdnaTest kit (Adna Gen AG, Langenhagen, Germany) was used to analyze EMT and the presence of a marker of breast stem cells.

Results. The overall detection rate of the CTCs was 67.6%. A group of 51 women from 69 patients (74%) were positive for at least one of the EMT markers, and 32 of 69 patients (46.4%) were positive for ALDH1. In the CTCs group of positive samples, the expression of EMT markers was 3% (TWIST), 70% (Akt2), and 52% (PI3Ka).

Conclusions. Improving the search and functional evaluation of residual CTCs with stem cell self-renewal properties in combination with traditional chemotherapy can provide a specific approach to preventing recurrence of cancer and improve long-term survival.

Keywords: breast cancer, CTCs stem cell, epithelial-mesenchymal transition.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на достигнутый определенный прогресс в лечении рака молочной железы (РМЖ) с помощью комплексного подхода с учетом известных на сегодняшний день молекулярных подтипов опухоли, современной таргетной терапии, отдаленные метастазы могут развиваться у 30–90% пациенток с первичным РМЖ. Общепринято, что субстратом для метастазирования являются циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), наличие которых в организме пациентки определяется таким понятием, как минимальная остаточная болезнь (МОБ). ЦОК были впервые обнаружены австралийским патологом Томасом Эшвортом в 1869 г., который описал отдельные клетки и клеточные кластеры в крови пациента и предложил роль ЦОК в метастатическом процессе [1]. Однако далеко не все ЦОК могут

образовывать истинные метастазы. Для того чтобы опухолевая клетка могла выйти из кровеносного сосуда, она должна пройти так называемый эпителиально-мезенхимальный переход (EMT – epithelial-mesenchymal transition) [2].

Важным моментом в лечении РМЖ является тот факт, что ряд клеток остаются нечувствительными к проводимой терапии. Одной из версий, которые могли бы, по крайней мере, частично объяснить неэффективность лечения, является теория раковых стволовых клеток (cancer stem cells (CSC)). Эта теория предполагает, что рак может возникать и развиваться из небольшой части стволовых клеток, которые способны вызывать рост опухоли, а также влиять на резистентность к химио- и лучевой терапии. Согласно данным литературы, ряд генов играют ключевую роль в процессе EMT и обеспечивают развитие резистентности к химиотерапии, тем самым поддерживая фенотип стволовой клетки. К таким генам следует отнести Twist, PI3K α , Akt2, а также маркер стволовой опухолевой клетки РМЖ ALDH1 [3, 4].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить экспрессию генетических маркеров эпителиально-мезенхимального перехода Twist, PI3K α , Akt2 и маркера опухолевой стволовой клетки ALDH1 в ЦОК при первичном нематастатическом раке молочной железы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 102 пациентки с верифицированным первичным нематастатическим раком молочной железы (pT1–4, pN0–3, M0), которые получали специальное лечение в период 2016–2017 гг. Характеристика пациенток на момент постановки диагноза показана в табл. 1.

Большинство пациентов имели опухоли размером менее 2 см и без метастазов в регионарные лимфатические узлы. В общей сложности 82 из 102 (80,3%) опухолей

Таблица 1
Характеристика пациенток, страдающих РМЖ, включенных в исследование

Признак		n	%	ЦОК+	%
		102	100%	69	67,6%
T	T1	70	68,9%	38	54,3%
	T2–4	32	31,1%	31	96,9%
N	N-позитивные	35	34,4%	35	100,0%
	N-негативные	67	65,6%	34	50,7%
	N1	25	24,6%	25	100,0%
	N2	2	1,6%	2	100,0%
	N3	8	8,2%	8	100,0%
Морфология	Протоковая карцинома	54	52,5%	33	61,1%
	Дольковая карцинома	23	23,0%	17	73,9%
	Другой тип	25	24,6%	19	76,0%
	G1	7	6,6%	3	42,9%
	G2	50	49,2%	31	62,0%
	G3	45	44,3%	35	77,8%
	Люминальный A	82	80,3%	34	41,5%
	Люминальный B	7	6,6%	2	28,6%
	Гиперэкспрессирующий Her2	7	6,6%	3	42,9%
Трижды негативный	7	6,6%	2	28,6%	

были отнесены к люминальному А молекулярному подтипу, и по 7 (6,6%) были в равной степени отнесены к люминальному В, Her2-гиперэкспрессирующему и трижды негативному подтипам РМЖ.

У всех пациенток до начала специального лечения забирался образец периферической крови в объеме 5 мл в стерильную вакуумную пробирку с КЭДТА для обогащения и выделения ЦОК и хранили при 4 °С до исследования. Образцы обрабатывались немедленно или не позднее, чем через четыре часа после забора крови.

Обогащение и выделение ЦОК проводилось с использованием уникальной технологии экспресс-выделения опухолевых клеток из цельной крови на основе ковалентно-связанных антител для CD326 на немагнитную полимерную матрицу крупных микросфер с последующей изоляцией ЦОК по размеру.

Выделение мРНК из лизированных, обогащенных клеток проводилось в соответствии с инструкциями производителя наборов для выделения РНК (ООО «СИВитал», Беларусь). С помощью технологии обратной транскрипции синтезировали кДНК, которую использовали в последующем для анализа экспрессии генов в режиме real-time PCR.

Для анализа эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) и наличия маркера стволовых клеток рака молочной железы использовали набор AdnaTest EMT-1/ StemCell (Adna Gen AG, Langenhagen, Germany). Данная тест-система включает в себя один маркер стволовых клеток РМЖ ALDH1 и 3 маркера EMT – Akt2, PI3K и TWIST.

Оба теста требуют обогащения ЦОК из 5 мл крови для одноплексного ПЦР-анализа на стволовые клетки и для мультиплексного анализа ПЦР-анализа маркеров EMT, а также актина в качестве внутреннего контроля. Дополнительно определяли экспрессию референсного гена «домашнего хозяйства» с-AVL. «Засорение» лейкоцитами в данной тест-системе (около 1500 на образец) снижается в 10 раз с помощью применения специального буфера AdnaWash, что позволяет правильно дифференцировать профили экспрессии EMT и опухолевых стволовых клеток со специфичностью >90%.

Учитывая уникальность технологии обогащения и выделения ЦОК, само уже определение экспрессии референсных генов актина и с-AVL подтверждало наличие в образце опухолевых клеток экспрессирующих на своей поверхности ErCAM (CD 326). Оценка нормализованной экспрессии таргетных генов маркеров EMT и стволовой клетки позволяло оценить функциональный фенотип ЦОК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

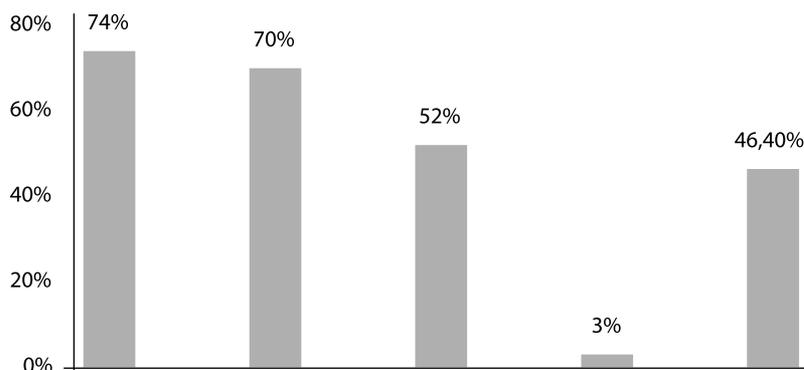
Общая частота обнаружения ЦОК составила 67,6% (69 из 102 пациенток).

Все обогащенные образцы были исследованы на маркеры ALDH1 и EMT и, соответственно, коррелировали с присутствием в образцах ЦОК.

Положительной по меньшей мере для одного из маркеров EMT была 51 из 69 пациенток (74%), а 32 из 69 пациенток (46,4%) были положительными для ALDH1, соответственно (см. рисунок). В табл. 2 показан более подробный анализ

Таблица 2
Экспрессия маркеров EMT и ALDH1 у пациенток, страдающих РМЖ с ЦОК-положительными образцами периферической крови

ЦОК положительные образцы	N	Генетические маркеры				
		EMT	AKT	PI3K	TWIST	ALDH1
	69 (67,6%)	51 (74%)	48 (70%)	36 (52%)	2 (3%)	32 (46,4%)



Генетические маркеры EMT и стволовой клетки, определяемые в ЦОК-положительных образцах периферической крови пациенток, страдающих РМЖ

распределения отдельных маркеров в ЦОК-положительной группе пациенток. В группе ЦОК положительных образцов показатели экспрессии маркеров EMT составляли 3% (TWIST), 70% (Akt2) и 52% (PI3Ka).

Данное исследование ставит перед собой цель предоставить ценную клиническую информацию для лечения пациенток, страдающих РМЖ, и, главным образом, рассматривает вопрос о том, следует ли изменить существующий протокол лечения женщин в соответствии с константным обнаружением функционально активных ЦОК в периферической крови после 3–6 недель терапии вместо того, чтобы ждать появления клинических и рентгенологических доказательств прогрессирования опухолевого процесса.

Не вызывает сомнения, что обнаружение и подсчет количества ЦОК имеет высокую прогностическую значимость для РМЖ, однако, как показывает опыт, использование наиболее частой технологии захвата ЦОК на основе EpCAM не в состоянии обнаружить всю гетерогенную популяцию этих патологических клеток [5]. Кроме того, их биологические особенности до настоящего времени плохо изучены, и предполагается, что только некоторые ЦОК могут образовать истинные клинически выраженные метастазы [2]. Более того, современная теория прогрессирования РМЖ состоит в том, что процессы EMT играют ключевую роль как в первичной опухоли, так и на этапах запуска метастатического каскада, а также в создании так называемых стволовых клеток РМЖ [3].

Недавно опубликованные данные в небольших группах пациентов подтверждают данные, полученные в нашем исследовании. Raimondi et al. [6] изучали экспрессию маркеров EMT и стволовой клетки у 92 пациенток с РМЖ на всех стадиях заболевания. Используя стандартное определение ЦОК как EpCAM+ / CK+ / CD45–, авторы не смогли найти их у 31 из 92 (34%) пациенток. Отсутствие ЦОК авторами было определено как недостаток экспрессии в обогащенной фракции EpCAM. Тем не менее в 12/31 (38%) этих СК-негативных клетках они обнаружили экспрессию маркеров EMT, в частности виментина и фибронектина. Они пришли к выводу, что примененный ими метод выявления ЦОК недооценивают наиболее важные субпопуляции ЦОК, участвующие в распространении рака [6].

В ретроспективном исследовании, включавшем 292 пациенток с метастатическим раком молочной железы, количество ЦОК было подсчитано до того, как пациентки начали новую линию лечения с использованием системы Cell-Search. ЦОК не были обнаружены у 36% пациенток. При многофакторном анализе было установлено, что метастазы в мозг и поражение костей оставались независимыми переменными,

связанными с неопределяемым статусом по ЦОК. Кроме того, у пациенток с высокой степенью злокачественности опухоли при тройном негативном раке и воспалительных формах РМЖ были увеличены вероятности для неопределяемого показателя ЦОК. Авторы предположили, что эти результаты могут быть вызваны недостатком системы CellSearch, которая не может уловить ЦОК, проходящих ЕМТ [7].

В настоящее время весьма актуальным является вопрос о том, может ли анализ периферической крови на ЦОК заменить анализ костного мозга на ДОК. В недавно опубликованном исследовании, сравнившем ДОК и ЦОК у пациенток с первичным РМЖ, была установлена слабая корреляционная зависимость между присутствием этих клеток в костном мозге и периферической крови, что может быть связано с разной биологией этих клеток и их генетической характеристикой [8]. Эти данные согласуются с другими сравнительными исследованиями, в которых, как было показано, корреляция между ДОК и ЦОК была низкой [9]. Однако в двух других недавно опубликованных исследованиях было обнаружено, что определение статуса по ЦОК с помощью ОТ-ПЦР передавало клинически значимую информацию, которая не уступала статусу по ДОК при РМЖ [10].

Существуют различные объяснения этого явления:

1. Отсутствие ЦОК, как описано выше Mego et al., может зависеть от неадекватности процедур отбора стандартов ЦОК. Большинство процедур выбора основаны только на ЕрСАМ, который, возможно, перестает экспрессироваться во время прохождения ЕМТ.
2. ЕМТ-клетки, разрушающие окружающую матрицу, также позволяют отделяться и распространяться не-ЕМТ опухолевым клеткам. Таким образом, ДОК и ЦОК могут отражать разные гетерогенные популяции опухолевых клеток первичной опухоли, включая дифференцированные и более стволовые опухолеподобные клетки.
3. Можно также предположить, что для образования метастазов в кости требуется реализация другого механизма распространения или эпителиальной дифференцировки. Был описан путь PTEN/Akt/mTOR как один из основных путей регуляции стволовых клеток/предшественников млекопитающих клеток. Кроме того, этот путь обеспечивает устойчивость к традиционной терапии и играет центральную роль в жизнеспособности раковых стволовых клеток в молочной железе, способствуя пролиферации и ингибированию апоптоза [11]. Кроме того, клетки, проходящие ЕМТ, развивают устойчивость к противоопухолевым средствам [12].

В настоящее время только в нескольких исследованиях была принята попытка изучить эти вопросы применительно к ЦОК. Анализируя цитоспины мононуклеарных клеток с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в образцах периферической крови 28 пациенток с 17 СК-положительными и 17 СК-отрицательными ЦОК, фосфорилированная PI-3-киназа (PI3K) была зарегистрирована в 15 из 17 СК-положительных образцах [13]. В недавнем исследовании авторы проанализировали мононуклеарные клетки периферической крови у 32 пациенток с цитокератином-19 мРНК-позитивными ЦОК с ранними и 16 пациенток с метастатическим РМЖ и сообщили, что PI3K/Akt были идентифицированы в значительной части ЦОК [14]. Эти данные согласуются с данными, полученными в ходе нашего исследования.

Таким образом, было обнаружено, что экспрессия маркеров стволовых клеток и маркеров ЕМТ в ЦОК связана с резистентностью к традиционным противоопухолевым препаратам, подчеркивая актуальность совершенствования

инструментов для диагностики и лечения минимального остаточного заболевания [15]. Следовательно, обнаружение стволовых клеток может рекомендоваться для диагностических и терапевтических действий, а сигнальные пути, которые поддерживают опухолевые стволовые клетки, являются привлекательными мишенями для этих исследований. Кроме того, следует отметить необходимость поиска новых маркеров как ЕМТ, так и стволовых клеток. Уникальным маркером в данном случае можно рассматривать ген *BIRC5* и кодируемый им антиапоптотический белок сурвивин. Подавление апоптоза является завершающей стадией ЕМТ, соответственно, использование оценки экспрессии данного гена может служить уникальным маркером не только для поиска ЦОК и диагностики минимальной остаточной болезни, но и для прогноза течения опухолевого процесса и контроля эффективности проводимой полихимиотерапии.

ВЫВОДЫ

Гипотеза раковых стволовых клеток – это новая парадигма, которая может оказать серьезное влияние на лечение болезней, определяя новую цель для лечения рака. Современные методы лечения рака показали эффективность при удалении основной массы дифференцированных раковых клеток, в то время как устранить стволовые клетки рака, ответственные за рецидив опухоли, не удалось. Совершенствование поиска и функциональной оценки остаточных циркулирующих или диссеминированных опухолевых клеток со свойствами самообновления стволовых клеток в сочетании с традиционной химиотерапией может обеспечить конкретный подход к предотвращению рецидива рака и улучшить долгосрочную выживаемость.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ashworth T.R. (1869) A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australian Med J.*, vol. 14, pp. 146–7.
2. Jolly M.K., Tripathi S.C., Jia D., Mooney S.M., Celiktas M., Hanash S.M., Mani S.A., Pienta K.J., Ben-Jacob E. (2016) Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget*, vol. 7, no 19, pp. 27067–27084. doi: 10.18632/oncotarget.8166.
3. Khan M.A., Tania M., Wei C., Mei Z., Fu S., Cheng J., Xu J., Fu J. (2015). Thymoquinone inhibits cancer metastasis by downregulating TWIST1 expression to reduce epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget*, vol. 6, pp. 19580–19591. doi: 10.18632/oncotarget.3973.
4. Khan M.A., Chen H.C., Zhang D., Fu J. (2013) Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumour Biology*, vol. 34, no 5, pp. 2497–2506. doi: 10.1007/s13277-013-1002-x.
5. Königsberg R., Obermayr E., Bises G., Pfeiler G., Gneist M., Wrba F., de Santis M., Zeillinger R., Hudec M., Dittrich C. (2011) Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.*, vol. 50, pp. 700–710.
6. Raimondi C., Gradilone A., Naso G., Vincenzi B., Petracca A., Nicolazzo C., Palazzo A., Saltarelli R., Spremberg F., Cortesi E., Gazzaniga P. (2011) Epithelial- mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.*, vol. 130, pp. 449–455.
7. Mego M., De Giorgi U., Dawood S., Wang X., Valero V., Andreopoulou E., Handy B., Ueno N.T., Reuben J.M., Cristofanilli M. (2011) Characterization of metastatic breast cancer patients with nondetectable circulating tumor cells. *Int J Cancer*, vol. 129, pp. 417–423.
8. Fehm T., Hoffmann O., Aktas B., Solomayer E.F., Wallwiener D., Kimmig R., Kasimir-Bauer S. (2009) Detection and characterization of circulating tumor cells in blood of primary breast cancer patients by RT-PCR and comparison to status of bone marrow disseminated cells. *Breast Cancer Res.*, vol. 11, R59.
9. Daskalaki A., Agelaki S., Perraki M., Apostolaki S., Xenidis N., Stathopoulos E., Kontopodis E., Hatzidakis D., Mavroudis D., Georgoulas V. (2009) Detection of cytokeratin-19 mRNA-positive

- cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with operable breast cancer. *Br J Cancer*, vol. 101, pp. 589–597.
10. Slade M.J., Payne R., Riethdorf S., Ward B., Zaidi S.A., Stebbing J., Palmieri C., Sinnott H.D., Kulinskaya E., Pitfield T., McCormack R.T., Pantel K., Coombes R.C. (2009) Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood- circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment. *Br J Cancer*, vol. 100, pp. 160–166.
 11. Sabbah M., Emami S., Redeuilh G., Julien S., Prevost G., Zimber A., Ouelaa R., Bracke M., De Wever O., Gespach C. (2008) Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat.*, vol. 11, pp. 123–151.
 12. Kallergi G., Mavroudis D., Georgoulas V., Stournaras C. (2007) Phosphorylation of FAK, PI-3K, and impaired actin organization in CK-positive micrometastatic breast cancer cells. *Mol Med.*, vol. 13, pp. 79–88.
 13. Monteiro J., Fodde R. (2010) Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives. *Eur J Cancer*, vol. 46, pp. 1198–1203.
 14. Kallergi G., Agelaki S., Kalykaki A., Stournaras C., Mavroudis D., Georgoulas V. (2008) Phosphorylated EGFR and PI3K/Akt signaling kinases are expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.*, vol. 10, R8.
 15. Bachelot T., Bourcier C., Cropet C., Guastalla J-P., Ferrero J-M., Leger- Falandry C., Soulie P., Eymard J.-C., Debled M., Spaeth D., Legouffe E., Delozier T., El Kouri C., Chidiac J. (2010): TAMRAD: A GINECO randomized phase II trial of Everolimus in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone in patients (pts) with hormone-receptor positive, HER2 negative metastatic breast cancer (MBC) with prior exposure to aromatase inhibitors (AI). *Cancer Res.*, vol. 70, p. 77.

Поступила/Received: 20.06.2017

Контакты/Contacts: evgenij-shlyakhtunov@yandex.ru

Иванкова В.С., Скоморохова Т.В., Столярова О.Ю., Галяс О.В.
Национальный институт рака, Киев, Украина

Ivankova V., Skomorokhova T., Stolarova O., Halyas O.
National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine

Современная лучевая терапия в лечении пациентов со злокачественными новообразованиями верхних дыхательных путей

Modern radiotherapy of treatment malignancies
upper respiratory tract

Резюме

Актуальность: основная задача лучевой терапии – подведение к опухоли тумороцидной дозы при минимально возможной нагрузке на окружающие здоровые ткани. Учитывая наличие высокотехнологичной аппаратуры, на сегодня это индивидуализированный подход к реализации всех звеньев технологической цепи: выбор метода дистанционной лучевой терапии, проведение качественной предлучевой топометрической подготовки пациента, расчет плана облучения, подведение максимальной дозы в мишени.

Цель: оценка эффективности лучевой терапии пациентов с местнораспространенными формами злокачественных новообразований верхних дыхательных путей (ЗНВДП) с использованием современных технологий на высокотехнологичной аппаратуре по сравнению со стандартным лечением.

Материалы и методы. На базе Национального института рака в отделении радиационной онкологии проведено лечение 121 пациента со злокачественными новообразованиями верхних дыхательных путей. Пациенты были разделены на три группы: 1 группа лечилась на линейном ускорителе электронов (ЛПЭ) Mevatron-KD2 – 32 пациента, 2 группа – на ЛПЭ Clinac-2100 – 41 пациент и 3 группа – на кобальтовых аппаратах «Рокус АМ» и «Тератрон» – 48 пациентов. Всем пациентам проводили дистанционную лучевую терапию с предыдущей предлучевой топометрической подготовкой. В результате этого в 1 и 3 группах во время лечения отмечались лучевые реакции II–III степени, что приводило к вынужденному перерыву в лечении.

Результаты: у большинства пациентов со злокачественными новообразованиями ВДП удалось достичь регрессии опухоли и существенного улучшения качества жизни. Лучший результат отмечен у лиц, которым топометрическую подготовку проводили с использованием 3D-планирования. Положительные отзывы пациентов, которым лечение проводилось по современным технологиям, повысились более чем на 13%. Безрецидивная трехлетняя выживаемость лиц с опухолями верхних дыхательных путей была в 2 раза выше по сравнению с контрольной группой.

Ключевые слова: предлучевая топометрическая подготовка, мишень облучения, опухолевый очаг, дистанционная лучевая терапия, туморицидная доза.

Abstract

Actuality: the main task of radiotherapy is to bring tumorous dosage to the tumor with the minimal possible load on the surrounding healthy tissues. Given the availability of high-tech equipment, today this is an individualized approach to the implementation of all links of the technological chain: the choice of the method of remote radiation therapy, the quality pre-radial topometric preparation of the patient, the calculation of the radiation plan, the maximum dose in the target.

Purpose: the aim of the study is to evaluate the effectiveness of radiotherapy in patients with locally advanced malignant neoplasms of the upper respiratory tract using modern technologies on high-tech equipment in comparison with standard treatment.

Materials and methods: 121 patients with malignant neoplasms of the upper respiratory tract were treated at the National Cancer Institute in the Department of Radiation Oncology. Patients were divided into three groups: group 1 patients were treated on the device with a linear electron accelerator Mevatron KD2 – 32 patients, the second group – on the LET Clinac 2100 – 41 patients and the 3rd group – on the cobalt devices Rokus AM and Teratron – 48 patients. All patients underwent remote radiation therapy with the previous pre-radial topometric preparation. As a result, patients with groups 1 and 3 experienced radiation reactions II–III during treatment, which led to a forced interruption in treatment.

Results. As a result of the software, the majority of patients with malignant neoplasms of the malignancies upper respiratory tract managed to achieve regression of the tumor and a significant improvement in the quality of life. The best result was noted in patients who received topometric training using 3D-planning. Positive feedback from patients who received treatment according to modern technology, increased bilsche than 13%. The recurrence-free three-year survival rate of patients with upper respiratory tract tumors was 2 times higher than in the control group.

Keywords: before radiotherapy topometriceskaya training, target irradiation, tumor center, external beam radiation therapy, tumorotsid dose.

ВВЕДЕНИЕ

Радиационная онкология в настоящее время является наиболее стремительной в развитии и наиболее перспективной отраслью в онкологии. Сегодня в практику врача-радиолога широко воплощаются современные кобальтовые гамма-аппараты, линейные ускорители электронов (ЛПЭ) с пучками различной энергии, специализированные линейные ускорители электронов для стереотаксического облучения, аппараты типа гамма-нож, кибернож. При проведении предлучевой топометрической подготовки кроме симуляторов используют спиральные компьютерные томографы (СКТ, КТ) с функцией виртуальной симуляции, устройства для иммобилизации пациента, а также компьютерные системы трехмерного и четырехмерного планирования. Современные технологии дистанционной лучевой терапии (ДЛТ) с использованием многолепестковых

коллиматоров, индивидуальных защитных блоков и др., направленные на повышение эффективности конформной лучевой терапии (КЛТ) за счет максимально повреждающего действия на опухоль и значительном уменьшении объема облучения окружающих здоровых тканей [1, 2].

Главной целью лучевой терапии (ЛТ) в течение всего периода ее использования является соблюдение основного радиотерапевтического принципа: максимальная доза ионизирующего излучения на опухоль и уменьшение лучевой нагрузки на окружающие здоровые ткани [2]. Лучевые повреждения слизистой оболочки нередко нивелируют достигнутые результаты лечения основного заболевания, отдалают возможность проведения дальнейшего этапа хирургического лечения, создают риск развития послеоперационных осложнений, ухудшающих психическое состояние пациентов, и снижают качество их жизни в этот период [3–5, 7].

В процессе подготовки к лучевому лечению использование современных технологий топометрии дает возможность использовать объемное трехмерное планирование в 3D, что позволяет создать необходимое распределение дозы на весь объем мишени с максимумом в зоне опухоли и свести к минимуму дозную нагрузку на окружающие здоровые ткани и тем самым снизить количество лучевых осложнений [6–8].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка эффективности лучевой терапии пациентов с местно-распространенными формами злокачественных новообразований верхних дыхательных путей (ЗНВДП) с использованием современных технологий на высокотехнологичной аппаратуре по сравнению со стандартным лечением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период с 2001 по 2016 г. на базе Национального института рака в отделении радиационной онкологии проведено лечение 121 пациента со злокачественными новообразованиями верхних дыхательных путей (T2b-4N0-1M0).

Морфологический тип строения опухолей определен в 121 случае с опухолями верхних дыхательных путей в соответствии с Международной гистологической классификацией ВОЗ (№ 19).

Для анализа результатов терапии пациентов со злокачественными опухолями верхних дыхательных путей вся исследовательская группа была разделена на группы в зависимости от локализации опухолевого процесса и гистологической формы новообразований (табл. 1).

Таблица 1
Распределение пациентов в зависимости от локализации и гистологической формы новообразований, n (%)

Локализация процесса	Эпителиальные опухоли, n (%)	Неэпителиальные опухоли, n (%)	Неклассифицированные опухоли, n (%)	Всего, n (%)
Полость носа	8 (6,7%)	4 (3,3%)	3 (2,4%)	15 (12,4%)
Верхнечелюстная пазуха	32 (26,4%)	4 (3,3%)	0 (0%)	36 (29,7%)
Альвеолярный отросток верхней челюсти и твердого неба	34 (28,1%)	5 (4,1%)	4 (3,3%)	43 (78,5%)
Носоглотка	21 (17,4%)	0 (0%)	6 (5,0%)	27 (22%)
Всего	95 (78,6%)	13 (10,7%)	13 (10,7%)	121 (100%)

Возраст пациентов, вовлеченных в исследование, колебался от 20 до 84 лет, преимущественно от 43 до 55 лет; средний возраст пациентов составлял $48,9 \pm 1,7$ года.

Из представленных данных в табл. 2 по полу преобладали мужчины – 67,8%, женщин было 32,2%.

Исходя из данных, приведенных в табл. 3, в опытной группе пациентов со злокачественными новообразованиями верхних дыхательных путей преобладали пациенты с распространенностью опухолевого процесса T4 – в 58 случаях (48,0%), ст. T3 – в 51 случае (42,0%) и ст. T2 – у 12 пациентов (10,0%).

Для получения данных, необходимых для планирования ЛТ, нужно было соблюдать требования идентичные условиям проведения в дальнейшем ЛТ. Компьютерная томография для планирования ЛТ проводилась с использованием всех приспособлений (подголовники, фиксирующие приспособления) необходимых для заключения пациента. Обязательным было получение в качестве начальной топометрической информации набора компьютерных томограмм по всей высоте распространенности процесса и зон профилактического облучения. Шаг сканирования определялся в зависимости от конкретной клинической ситуации. На каждой полученной таким образом томограмме проводилось определение объемов мишени и критических органов [1, 3, 6].

Для осуществления ЛТ нужна четкая последовательность на всех этапах топометрической подготовки:

I. Определение области мишени для проведения дальнейшего сканирования на КТ;

Таблица 2
Распределение пациентов со злокачественными опухолями верхних дыхательных путей по полу и возрасту, n (%)

Пол	Всего	Возраст пациентов, годы						
		<20	20–29	30–39	40–49	50–59	60–69	>70
Мужчины	82 (67,8)	2 (1,6)	6 (5,0)	3 (2,5)	18 (14,9)	21 (17,4)	21 (17,4)	11 (9,0)
Женщины	39 (32,2)	6 (5,0)	3 (2,5)	3 (2,5)	5 (4,1)	9 (7,4)	11 (9,0)	2 (1,7)
Всего	121 (100)	8 (6,6)	9 (7,5)	6 (5,0)	23 (19,0)	30 (24,8)	32 (26,4)	13 (10,7)

Таблица 3
Распределение пациентов с опухолями верхних дыхательных путей по стадиям опухолевого процесса

Локализация опухоли	Количество пациентов, n (%)	Распространенность опухолевого процесса, n (%)		
		T2NO; T2N1-3	T3NO; T3N1-3	T4NO; T4N1
Полость носа	9 (7,5)	6 (4,9)	4 (3,3)	3 (2,5)
Верхнечелюстная пазуха	52 (42,8)	2 (1,7)	19 (15,6)	27 (22,3)
Альвеолярный отросток верхней челюсти и твердого неба	42 (34,8)	2 (1,7)	21 (17,4)	19 (15,7)
Носоглотка, твердое небо	18 (14,9)	2 (1,7)	7 (5,7)	9 (7,5)
Всего	121 (100,0)	12 (10,0)	51 (42,0)	58 (48,0)

Примечание: международная классификация TNM на неклассифицированные, неэпителиальные опухоли, цилиндомы и папилломы не распространяется.

- II. Выполнение КТ с пошаговым сканированием. Шаг определялся в зависимости от конкретной клинической ситуации с последующим вынесением референтной точки;
- III. Осуществление планирования полей облучения на трехмерной планирующей системе;
- IV. Вынесение полей облучения на кожу/маску пациента с использованием аппарата симулятора [4, 5, 10].

Для решения основной задачи ЛТ – подведение к опухоли тумороцидной дозы при минимально возможной нагрузке на здоровые ткани – использовали индивидуализированный подход к реализации всех звеньев технологической цепочки:

- выбор метода ЛТ;
- проведение топометрической подготовки пациента;
- расчет плана облучения;
- подведение дозы к биологической мишени.

К планированию КЛТ определялись два объема – GTV и CTV.

GTV (Gross Tumor Volume) – визуально и клинически определенный макроскопический объем опухоли. CTV (Clinical Target Volume) – клинический объем мишени (первичный очаг и пути лимфатического оттока). При планировании ПО определялись PTV и критические органы PTV (Planning Target Volume). В результате планирования должны быть описаны два объема: Treated volume (TV) и Irradiated volume (IV). Таким образом, GTV и CTV – клинический объем мишени – чисто анатомо-клиническая концепция, а PTV – геометрическая концепция.

Дополнительным критерием оценки качества плана облучения было использование гистограмм «доза – объем» (DVH – Dose Volume Histogram). На основе анализа DVH был избран оптимальный план из созданных. При этом оптимальным считался тот план, для которого доза на опухоль максимальная (на PTV должна быть не менее 95% дозы), а на критические органы – минимальная.

Расчет планов облучения осуществлялся с использованием специальных программ.

Распределение дозы рассчитывалось и отображалось на экране дисплея совместно с анатомическими структурами. Важным положительным свойством системы планирования является возможность построения реконструированного цифровым способом снимка пациента для каждого из полей облучения. Такой снимок нужен для последующего сравнения с изображением, полученным на КТ с функцией виртуальной симуляции и верификацией плана облучения, индивидуального для каждого пациента.

С целью выбора лечения пациенты были разделены на три группы: 1 группа – 32 пациента 3Н ВДП (T2b-4N0-1M0), которые получали курс ДЛТ на аппарате ЛУЭ Mevatron-KD2 с предварительной предлучевой 2D и топометрической подготовкой на компьютерном рентгеновском томографе Somatom CR и планирующей системе (ПС) Theraplan Plus, версия 3.5 (MDS Nordion, Канада), 2 группа – 41 пациент 3Н ВДП (T2b-4N0-1M0), лечение проводилось на ЛУЭ Clinac-2100 с предлучевой 3D-топометрической подготовкой на КТ с функцией виртуальной симуляции, системой компьютерного планирования Eclipse. Процесс планирования начинался с генерирования трехмерной модели пациента. При этом использовалась серия параллельных компьютерных томографических сканов. Анатомические структуры и планируемый объем мишени определялись на каждом из сканов вручную. Третья

группа – 48 пациентов ЗН ВДП (T2b-4N0-1M0), которые получали курс ДЛТ на аппаратах «Рокус-АМ» и «Тератрон» с 2D-топометрической подготовкой на рентгеноскопическом аппарате типа «Симулятор».

Пациентам 1 и 2 групп топометрическую подготовку проводили на КТ с функцией виртуальной симуляции фиксирующими устройствами для облучения головы, клиньев и трех лазерных центраторов.

Первой группе пациентов лучевую терапию проводили на аппарате ЛУЭ Mevatron-KD2 также в два этапа. На первом этапе разовая очаговая доза (РОД) облучения составляла 2 Гр, 5 фракций в неделю до суммарной очаговой дозы (СОД) – 40 Гр. На втором этапе СОД доводили до 60 Гр. Перерыв между этапами составлял 14 суток.

Второй группе пациентов лечение проводили на аппарате ЛУЭ Clinac-2100 CD с предлучевой 3D-топометрической подготовкой на компьютерном рентгеновском томографе Philips и планирующей системе Eclipse. Всем пациентам выполняли фиксирования с помощью специальных фиксирующих масок, также использовали иммобилизирующее оборудование (подголовники, клинья, подставки под ноги) с последующим вынесением референтных меток на иммобилизирующую маску. Затем проводили компьютерное планирование (КП) на планирующей системе Eclipse. Пациенты получали курс ДЛТ суммарно до 60–64 Гр, РОД 2 Гр по 30–32 фракции без перерыва. На пути лимфатического оттока подводили СОД 46 Гр.

Первый этап лучевой терапии пациентам с опухолями верхних дыхательных путей 3 группы проводили на гамма-терапевтических установках «Рокус-АМ» или «Тератрон» с источником ионизирующего излучения Co60, РОД – 2,2–2,4 Гр, 5 фракций в неделю до СОД – 30 Гр на основной очаг. На втором этапе РОД составляла 2,2–2,4 Гр, 5 фракций в неделю до СОД – 60 Гр. Была применена двупольная методика (прямое и боковое поле на стороне поражения) размерами от 6×8 см до 10×10 см. Площадь полей подбирали индивидуально, в зависимости от размеров опухолевого поражения. Перерыв между этапами составлял 18 суток.

Контрольное обследование пациентов проводили не ранее, чем через 4–6 недель после окончания лучевой терапии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты проведенного лечения пациентов ЗН ВДП оценивали по регрессии опухоли, которую определяли сопоставлением динамики клинических показателей информации, полученной с помощью средств визуализации. Степень регрессии опухоли оценивали в соответствии с критериями RECIST (в 1994 г.) по изменениям наибольших размеров первичного опухолевого очага. Лучший результат отмечен у пациентов, которым проводили конформную лучевую терапию после топометрической подготовки с использованием 3D-планирования. Так, полная регрессия в 1 группе составила 18,7%, во 2 – 21,9%, а в 3 – 12,5% пациентов. Частичная регрессия была в 1 группе у 28,2% пациентов, во 2 – 29,4% и в 3 – у 22,9% пациентов. Что касается стабилизации процесса, то картина была следующая: 18,7% – в 1 группе пациентов, 26,8% – во 2 и 18,8% – в 3 группе, а показатель прогрессирования был выше у пациентов 3 группы (45,8%), по сравнению со 2 и 1 группой (21,9% и 34,4% соответственно). В табл. 4 представлена оценка лечения пациентов ЗН ВДП по степени регрессии опухоли.

Лучевые реакции оценивали по классификации радиотерапевтической онкологической группы совместно с Европейской организацией по исследованию и лечению рака (RTOG/EORTC, 1995), которая дополнена критериями Кооперативной группы исследователей. Так, общие лучевые реакции у пациентов наблюдались в

Таблица 4
Оценка лечения пациентов ЗН ВДП по степени регрессии опухоли

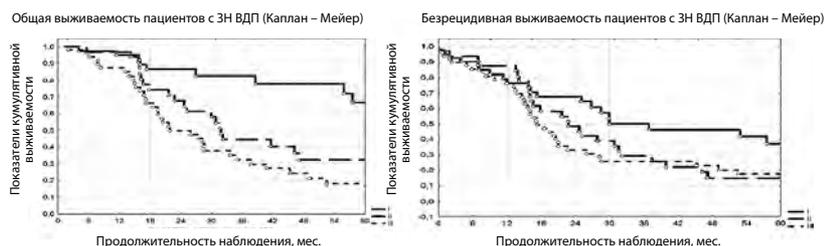
Результат	1 группа (n=32)	2 группа (n=41)	3 группа (n=48)
Полная регрессия	6 (18,7%)	9 (21,9%)	6 (12,5%)
Частичная регрессия	9 (28,2%)	12 (29,4%)	11 (22,9%)
Стабилизация	6 (18,7%)	11 (26,8%)	9 (18,8%)
Прогрессирование	11 (34,4%)	9 (21,9%)	22 (45,8%)

виде реактивных изменений слизистых оболочек и кожи и возникали у пациентов 1 группы – при СОД лучевой терапии 30–40 Гр, у пациентов 2 группы – при СОД 46–50 Гр, что позволило пациентам этих групп провести лечение в полном объеме без перерыва. Лучевые реакции в 3 группе возникали уже при СОД 20–26 Гр. В представленной ниже табл. 5 изображена токсичность проведенного лечения в зависимости от режима ДЛТ пациентов 1–3 групп.

Результаты общей выживаемости показали, что через 1 год после полученного лечения в 1 группе осталось 30 (95,2%) пациентов, во 2 группе – 35 (94,8%), а в 3 группе – 39 (86,9%). При изучении возникновения рецидивов установлено, что в 1 группе без рецидива осталось 27 (87,2%) пациентов против 28 (76,5%) 2 группы и 34 (76,3%) 3 группы соответственно, что свидетельствует в пользу метода лечение пациентов 2 группы (в 1,3 раза лучше). На второй год наблюдения общая выживаемость 1 группы составила 21 (66,7%) против 24 (85,0%) пациентов 2 группы и 21 (50,3%) 3 группы. Это в 1,5 раза выше выживаемость, чем в 1 и 3 группах. При этом пациентов без рецидива было больше во 2 группе, чем в 1 и 3: 19 (66,5%) против 15 (48,4%) и 14 (33,3%) соответственно. На третий год наблюдения во 2 группе остались живыми 17 (78,9%) человек против 13 (43,5%) пациентов 1 группы и 12 (32,8%) 3 группы, что свидетельствует в пользу проведенного лечения во 2 группе. Безрецидивный период на 3 год также достоверно отличался и был у 9 (29,1%) в 1 группе против 13 (47,2%) во 2 группе и 10 (24,9%) в 3 группе соответственно (результат в 2 раза лучше во 2 группе). На рисунке отражены показатели общей и безрецидивной выживаемости пациентов с ЗН ВДП с 3- и 5-летним выживанием по Каплану – Мейеру.

Таблица 5
Токсичность проведенного лечения в зависимости от режима ДЛТ пациентов 1–3 групп

Локализация лучевых реакций	Степень реакций	1 группа (n=32)	2 группа (n=41)	3 группа (n=48)
Кожа (эритема, сухой эпидермит)	1 ст.	20 (64,51)	18 (43,90)	22 (45,83)
	2 ст.	14 (34,14)	8 (25,81)	19 (39,58)
	3 ст.	7 (14,58)	3 (9,68)	9 (21,95)
	4 ст.	–	–	–
Слизистая оболочка (ринит, эпителиит, стоматит)	1 ст.	19 (46,34)	15 (64,51)	21 (43,75)
	2 ст.	12 (25,81)	10 (24,39)	18 (37,50)
	3 ст.	9 (18,75)	5 (12,90)	12 (29,26)
	4 ст.	–	–	–



Показатели общей и безрецидивной выживаемости пациентов с ЗН ВДП с 3- и 5-летним выживанием (по Каплану – Мейеру)

Несмотря на проведенную защиту критических органов блоком и клиновидными фильтрами, у пациентов возникали симптомы острого лучевого поражения кожи и слизистых оболочек. Чаще всего наблюдались слезотечение и гиперемия кожи. В отдельных случаях проявления дополнялись умеренным отеком кожи и частичной алопецией. Все пациенты с лучевыми поражениями получали необходимую медицинскую помощь под наблюдением отоларинголога.

Отражением общей реакции организма на лучевую терапию изменения кроветворения были незначительны. Контроль показателей периферической крови осуществляли с регулярностью 1 раз в неделю. Существенных отклонений от нормы со стороны красной и белой крови у пациентов не было.

ВЫВОДЫ

1. Использование современных технологий конформной лучевой терапии пациентов местнораспространенными формами злокачественных новообразований верхних дыхательных путей повышает непосредственные и отдаленные результаты лучевого лечения. Так, положительные отзывы пациентов, которым лечение проводилось по современным технологиям, повысились более чем на 13%. Безрецидивная трехлетняя выживаемость пациентов с опухолями верхних дыхательных путей была в 2 раза выше по сравнению с контрольной группой.
2. Применение разработанного оптимального комплекса предлучевой топометрической подготовки пациентов со злокачественными новообразованиями органов верхних дыхательных путей с использованием современных технологий планирования лучевой терапии позволило существенно снизить лучевые реакции и осложнения и провести запланированное лечение в полном объеме без вынужденного перерыва.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rubin Ph., Williams J.P. (2001) Principles of radiation oncology and cancer radiotherapy. *Clinical Oncology*, 8th ed. Philadelphia: W.B. SAUNDERS COMPANY, pp. 99–125.
2. Kostilev V. (2009) *Analysis status radyasyonnoy oncology in the world and in Russia*. Medical Physics, no 3, p. 104.
3. Kostilev V.A., Narkevich B.YA. (2008) *Technological provision radyasyon therapy*. Medical Physics, M. Medicine, pp. 139–160.
4. Tkachev S.I., Yur'eva T.V., Klimanov K.YU. (2005) Konformnaya lucheovaya therapy in Oncology. New medical-fyzicheskiye projects in oncology. Proceedings of the RONTs them. H.H. Blokhyn RAMS (26 January 2005), pp. 1–4.

5. Ratner T.G., Kancheli I.A., Eluzhenkova K.A. (2006) Clinical Application in histograms “dose-volume”. *Medical Physics*, no 1 (29), pp. 73–81.
6. Assenholt M.S., Petersen J.B., Nielsen S.K. (2008) A dose planning study on applicator guided stereotactic IMRT boost in combination with 3D MDIbased brachytherapy in locally advanced cervical cancer. *Acta Oncol.*, vol. 47(7), pp. 1337–1343.
7. Vaganov N.V. Garantii, Vazhenin A.V., Fokin L.A. (2005) Quality luchevoy therapy in physics in two main ways medytynskoy. Proceedings of the *Modern technologies in Oncology: VI All-Russian materials s'ezda onkologov in 2 vols.*, Rostov-on-Don, t. 1, pp. 7–8.
8. Kim S.I. (2002) Principles of Conduct predluchevoy topometrycheskoy preparation and irradiation Planning patients. Proceedings of the *Provision luchevoy therapy in quality*, Almaty, pp. 475–476.
9. Klepper L.YA., Ushkova V.L. (2003) “Express-method” Information about the presentation of объемном Structure obluchaemoho organism for Scheduling luchevoy therapy zlokachestvennyh tumors. *Med. physics*, no 1 (17), pp. 7–12.
10. Saharovskaya V.G., Ratner T.G., Yur'eva T.V., Hlebnikova N.L. (2004) NL Modern Stage of development methods topometrycheskoy the preparation of patients for irradiation. *Med. physics*, no 4, pp. 59–69.

Поступила/Received: 11.04.2017
Контакты/Contacts: info@unci.org.ua

УДК 616.155.392.2–036.11:616.15–018–089.843

Лавриненко В.А.¹, Марейко Ю.Е.¹, Красько О.В.², Березовская Е.Ю.¹, Доронина С.Н.¹, Стёганцева М.В.¹, Савицкая Т.В.¹, Минаковская Н.В.¹, Белевцев М.В.¹, Алейникова О.В.¹¹ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь² Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси, Минск, БеларусьLavrinenko V.¹, Marejko Yu.¹, Krasko O.², Berezovskaya E.¹, Doronina S.¹, Stegantseva M.¹, Savitskaya T.¹, Minakovskaya N.¹, Belevtsev M.¹, Aleinikova O.¹¹ Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus² United Institute of Informatics problems National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Исход аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с острым лейкозом в зависимости от уровня химеризма на 30-й день

Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on chimerism level on day-30

Резюме

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) является эффективным методом лечения острых лейкозов высокой группы риска. Однако развитие ранних рецидивов связано с крайне неблагоприятным прогнозом и ранней смертностью. Поэтому актуальной задачей является поиск маркеров раннего возврата заболевания. Целью нашего исследования была оценка прогностической значимости мониторинга химеризма в костном мозге (КМ) и периферической крови (ПК) в ранний посттрансплантационный период у пациентов с острым лейкозом. У пациентов со смешанным химеризмом (СХ, $\leq 99\%$) на +30 день в КМ по сравнению с пациентами с полным донорским химеризмом (ПДХ) была значительно выше 2-летняя кумулятивная частота развития рецидивов – $59,3 \pm 4,1\%$ vs $17,24 \pm 0,29\%$, $p=0,009$; ниже безрецидивная выживаемость – $14,8 \pm 13,3\%$ vs $74,1 \pm 6,0\%$, $p<0,001$; ниже общая выживаемость – $23,8 \pm 19,3\%$ vs $89,7 \pm 4,0\%$, $p=0,001$. Химеризм на +30 день в КМ, но не ПК, позволил предсказать развитие ранних рецидивов в первые полгода у 80% пациентов. Кумулятивная частота развития рецидивов на +180 день составила $44,4 \pm 3,3\%$ для пациентов со СХ в КМ на +30 день и $1,72 \pm 0,03\%$ для пациентов с ПДХ. Уровень химеризма в КМ был ниже, чем в ПК на +30 день, $p=0,024$. С низким уровнем донорского химеризма в ПК на +30 день после аллоТГСК были ассоциированы низкая клеточность трансплантата ($p=0,006$), ремиссия 2 и более ($p=0,033$), а в КМ – низкая клеточность трансплантата ($p=0,015$) и старший возраст реципиента ($p=0,020$). Уровень химеризма в КМ у пациентов с положительной минимальной остаточной болезнью (МОБ) был ниже – 99,04% (95,1–100%), чем у пациентов с негативной МОБ – 99,91% (95,66–100%), $p=0,036$.

Ключевые слова: химеризм, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, рецидив, острый лейкоз, прогноз, дети.

Abstract

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) is an effective treatment for patients with high-risk acute leukemia. However early relapses after HSCT are still associated with a very poor prognosis and early mortality. Therefore search for markers of early recurrence remains an actual task. The aim of this study was analyzing of the predictive value of chimerism level on day-30 in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) after alloHSCT in patients with acute leukemia. Patients with mixed chimerism (MC, <99%) on day-30 in BM had higher 2-year cumulative incidence of relapse compare to patients with full donor chimerism (FDC) – $59.3\pm 4.1\%$ vs $17.24\pm 0.29\%$, $p=0.009$; lower relapse free survival – $14.8\pm 13.3\%$ vs $74.1\pm 6.0\%$, $p<0.001$; lower overall survival – $23.8\pm 19.3\%$ vs $89.7\pm 4.0\%$, $p=0.001$. Chimerism on day-30 in BM, but not in PB, predicted early relapses in 80% patients. Cumulative incidence of relapse on day-180 was $44.4\pm 3.3\%$ for patients with MC on day-30 and $1.72\pm 0.03\%$ for patients with FDC. On day-30 chimerism level in BM was lower than in PB, $p=0.024$. Low nucleated cell dose ($p=0.006$) and remission ≥ 2 ($p=0.033$) was associated with MC in PB on day-30. Low nucleated cell dose ($p=0.015$) and older recipient age ($p=0.020$) was associated with MC in BM on day-30. Chimerism level in BM was lower in patents with positive minimal residual disease (MRD) – 99.04% ($95.1-100\%$) compare to patients with negative MRD – 99.91% ($95.66-100\%$), $p=0.036$.

Keywords: chimerism, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, relapse, acute leukemia, prognosis, children.

ВВЕДЕНИЕ

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) – важный, а иногда и единственный метод излечения пациентов с острыми лейкозами (ОЛ) высокой группы риска. Целью аллоТГСК при ОЛ является полная элиминация лейкозного клона, которая основана на двух принципах: 1) цитотоксическом эффекте лучевой и/или химиотерапии (кондиционирования) перед трансплантацией и 2) реакции «трансплантат против лейкоза» (РТПЛ), опосредованной иммунокомпетентными клетками трансплантата [1].

Несмотря на постоянное совершенствование подходов к проведению аллоТГСК, рецидив развивается у 30–35% пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) [2] и 34–40% пациентов с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) [3] и является одной из наиболее частых причин смертности после аллоТГСК [4, 5]. Согласно Center for International Blood and Marrow Transplant Registry (CIBMTR), рецидив является причиной смерти в 48% случаев при трансплантации от HLA-идентичного сиблинга и в 37% случаев при трансплантации от неродственного донора [5]. Половина рецидивов происходит в первые 6 месяцев после аллоТГСК [6–8]. Ранние рецидивы имеют наиболее неблагоприятный прогноз [6, 9], с низкой 2-летней выживаемостью около 3–9% в зависимости от времени между аллоТГСК и рецидивом [10]. Превентивная терапия, когда злокачественных клеток мало, может быть эффективна по сравнению с лечением рецидива [11, 12]. Поэтому выявление пациентов, имеющих высокий риск ранних рецидивов, должно быть сделано как можно раньше (в первый месяц после аллоТГСК), что даст достаточно времени для проведения иммунотерапии: отмены иммуносупрессии, инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ) и др. или проведения повторной аллоТГСК [4, 8, 11].

Оценить риск развития рецидива можно с помощью мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ) и химеризма (определения соотношения клеток донора и реципиента). При этом мониторинг МОБ возможен только у пациентов, имеющих специфический маркер (химерные онкогены, мутации, клональные перестройки Т-клеточного рецептора и генов иммуноглобулинов (TCR/Ig) или лейкоз-ассоциированный aberrантный иммунофенотип). При ОМЛ подходящий маркер для отслеживания МОБ выявляется только приблизительно в 60% случаев, тогда как исследование химеризма может быть выполнено у всех пациентов [13, 14].

Изучение химеризма после аллоТГСК стало одним из наиболее информативных исследований, которое позволяет оценить приживление трансплантата, предсказать развитие рецидива основного заболевания [15, 16]. В большинстве исследований уделялось внимание динамике химеризма. Увеличивающийся смешанный химеризм (СХ) был определен как неблагоприятный фактор, ассоциированный с развитием рецидивов. Однако превентивное лечение, в частности ИДЛ, на этой стадии имело ограниченный успех и рецидив развивался достаточно быстро [12, 13, 17, 18]. Кроме того, около одной трети всех рецидивов возникает до +100 дня после аллоТГСК [10], и, как правило, определить динамику химеризма у этих пациентов весьма затруднительно. Все это свидетельствует о необходимости более раннего выявления надвигающегося рецидива. Несколько групп исследователей сделали попытку оценить влияние химеризма в ранний период, на +14 день [19] или +30 день [20–28], на исход аллоТГСК, однако были получены противоречивые результаты. К тому же методы определения химеризма, использовавшиеся в этих исследованиях, не позволяли оценить влияние низкого уровня СХ (95–99,9%), так как обладали ограниченной чувствительностью (0,8–5%).

В данном исследовании мы оценили связь СХ, в том числе низкого уровня СХ +30 дня, с исходом первой аллоТГСК у 74 пациентов (дети и молодые взрослые) с острым лейкозом (ОЛ) после миелоаблативного кондиционирования (myeloablative conditioning, MAC).

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка прогностической значимости мониторинга химеризма в костном мозге (КМ) и периферической крови (ПК) в ранний посттрансплантационный период у пациентов с острым лейкозом, а также изучение факторов, оказывающих влияние на уровень химеризма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 74 пациента (дети и молодые взрослые) с ОЛ после первой аллоТГСК, проведенной с 2009 по 2016 г. в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии. Время между первичным диагнозом и аллоТГСК составило 0,3–12,4 (медиана 1) лет. Все пациенты получили миелоаблативное кондиционирование. Возраст реципиентов на момент трансплантации составил 1–32 (медиана 11) лет, из них 58 (80%) до 18 лет. В исследование не включались пациенты, у которых развился рецидив в течение первых 30 дней или отторжение трансплантата, а также те, у кого не было полной ремиссии на момент трансплантации. Одной из задач исследования была оценка значения низкого уровня смешанного химеризма, поэтому включены были только пациенты, имевшие информативные InDel маркеры для мониторинга химеризма с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с достаточной чувствительностью. Информированное согласие было получено у всех пациентов и/или их официальных опекунов. Характеристика пациентов и аллоТГСК приведена в табл. 1.

Таблица 1
Характеристика пациентов с ОЛ (n=74), включенных в исследование

Характеристика	Значение
Возраст реципиента, медиана (диапазон), лет	11 (1–32)
Возраст донора, медиана (диапазон), лет	28 (1–52)
Пол реципиента: мужской/женский, n (%)	48/26 (64,9/35,1%)
Пол донора: мужской/женский, n (%)	44/30 (59,5/40,5%)
Диагноз, n (%):	
– ОМЛ:	34 (45,9%)
– CR1	25
– CR2	7
– CR3	2
– ОЛЛ:	38 (51,4%)
– CR1	14
– CR2	19
– CR \geq 3	5
– Бифенотипический ОЛ, CR1	2 (2,7%)
Тип донора, n (%):	
– HLA-идентичный сиблинг	17 (23,0%)
– HLA-совместимый неродственный	35 (47,3%)
– HLA-несовместимый родственный	8 (10,8%)
– HLA-несовместимый неродственный	14 (18,9%)
Источник стволовых клеток, n (%):	
– Костный мозг	52 (70,3%)
– Периферические стволовые клетки	22 (29,7%)
Режим кондиционирования:	
– МАС на основе тотального облучения (total body irradiation, TBI)	59 (45,9%)
– МАС на основе бисульфана/треосульфана	34 (51,4%)
– МАС, другие	2 (2,7%)
Применение АТГ/ОКТ в кондиционировании, n (%)	59 (79,7%)
Лейкоциты до кондиционирования (–7 день)	3 (0,3–9,3)
Лейкоциты до кондиционирования (0 день)	0,2 (0,1–4,1)
Клеточность трансплантата, медиана (диапазон), 10 ⁸ /кг	4,3 (1,4–35,1)
CD34+–клеточность трансплантата, медиана (диапазон), 10 ⁶ /кг	5,8 (0,2–15,4)
CD3+–клеточность трансплантата, 10 ⁶ /кг	32,7 (1,3–519,5)
CD19+–клеточность трансплантата, 10 ⁶ /кг	10,2 (0,02–136,9)
Т-клеточная деплеция, n (%)	9 (12,2%)
Котрансплантация МСК, n (%)	8 (10,8%)
Профилактика РТПХ, n (%):	
– Ингибиторы кальциневрина (CNI)	22 (29,7%)
– CNI+–метотрексат (MTX)	45 (60,8%)
– CNI+–миклофенолата мофетил (MMF)	7 (9,5%)

Определение химеризма проводили в образцах КМ и/или ПК на +30 день после аллоТГСК. Мононуклеарные клетки выделялись на градиенте плотности Histopaque (Sigma-Aldrich, USA), ДНК выделялась фенол-хлороформной экстракцией. Определение химеризма проводилось двумя методами: ПЦР по InDel (инсерция/делеция) и по STR (коротким tandemным повторам) маркерам. Для исследования методом InDel-ПЦР была выбрана панель праймеров к полиморфизмам инсерция/делеция (InDel, insertion/deletion). Первоначально донора и реципиента генотипировали по 30 аллель-специфическим маркерам. Аллели считали информативными, если они были позитивными для реципиента и негативными для донора или наоборот [29]. Для амплификации STR-маркеров использовали коммерческий набор AmpFlSTR® SGM Plus® PCR Amplification Kit (ABI, UK), разделение продуктов ПЦР производили с помощью капиллярного электрофореза на анализаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Идентификацию аллелей осуществляли с использованием оригинального программного обеспечения GeneMapper (Applied Biosystems, США).

Полный донорский химеризм (ПДХ) – уровень химеризма с количеством клеток донора >99%. Смешанный химеризм (СХ) – уровень химеризма 5–99%.

Для определения МОБ использовалась ПЦР в реальном времени для выявления химерных онкогенов (BCR-ABL, MLL-ELL, MLL-AF4, MLL-AF6, MLL-AF9, MLL-AF10, OTT-MAL, TEL-AML, NPM-MLF1, CBFB-MYH11, AML1-ETO), дубликаций FLT3-ITDc пациент-специфическими праймерами, реаранжировок генов Ig/TCR [30] с чувствительностью 10^{-4} – 10^{-6} .

Статистическую обработку данных проводили с помощью статистического пакета R, версия 3.2.2. Сравнение в парных измерениях (уровень донорского химеризма в КМ и ПК) производилось по критерию согласованных пар Уилкоксона (Wilcoxon matched-pairs test). Зависимость между химеризмом на +30 день и другими количественными переменными оценивалась с помощью корреляции Спирмена, различия в группах – с помощью критерия Манна – Уитни в случае двух групп, или критерия Краскела – Уоллиса при трех и более группах. В мультивариантном анализе использовался показатель логарифма количества остаточных клеток реципиента как $\lg(100-N)*1000$, N – химеризм (%). Время до клинических событий (рецидив; смертность, связанная с лечением – treatment related mortality, TRM) измерялось от даты аллоТГСК. При оценке влияния уровня химеризма на +30 день на исход был использован ландмарк-анализ для предотвращения смещения оценок, точкой начала отсчета времени до события считался 30-й день после трансплантации (момент измерения химеризма). Показатели выживаемости рассчитывали по методу Kaplan – Meier и различия в выживаемости оценивались при помощи лог-рангового критерия. Для расчета кумулятивных частот событий применяли анализ конкурирующих рисков и определяли статистически значимые различия с помощью теста Грея. Проведен мультивариантный анализ факторов, влияющих на общую и бессобытийную выживаемость (регрессионная модель Кокса) и кумулятивную частоту развития рецидивов (регрессионная модель Файна и Грея). В анализ включались только те факторы, для которых статистическая значимость была $p < 0,1$ в унивариантном анализе. Отношение рисков (Hazard ratio, HR) и их доверительные интервалы рассчитывались как экспонента коэффициентов регрессии и их доверительных интервалов. Сравнение в группах по частоте развития РТПХ, наличия положительной МОБ в группах СХ и ПДХ проводили с помощью точного критерия Фишера.

Статистические различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химеризм на +30 день. Уровень химеризма на +30 день составил в ПК 95,96–100% (медиана 99,95%) и в КМ 95,10–100% (медиана 99,92%). Низкий уровень СХ (95–99%) в КМ/ПК выявлялся у 10 (13,5%) из 74 пациентов. Таким образом, после МАС пациенты достигали в большинстве ПДХ или реже низкого уровня СХ, но ни у кого не было СХ ниже 95%.

При сравнении методов STR-ПЦР и InDel-ПЦР, следует отметить, что СХ методом STR-ПЦР выявлялся только у 5 (50%) из 10 пациентов с низким уровнем СХ, что делает этот метод непригодным для выявления такого уровня химеризма.

Уровень химеризма в КМ был значительно ниже, чем в ПК, $p = 0,024$ (рис. 1). Это может объясняться наличием в КМ клеток стромы, которая может быть представлена клетками реципиента, и/или наличием опухолевых клеток.

Для проверки предположения о возможном вкладе опухолевых клеток в развитие СХ в КМ мы сравнили уровень химеризма в зависимости от наличия МОБ на +30 день у 37 пациентов, для которых был маркер МОБ. Уровень химеризма

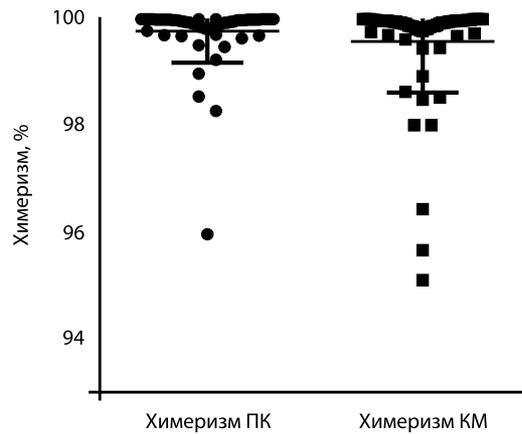


Рис. 1. Уровень химеризма в ПК и КМ на +30 день после аллотГСК

в КМ у пациентов с положительной МОБ был ниже 99,04% (95,1–100%), чем у пациентов с негативной МОБ – 99,91% (95,66–100%), $p=0,036$ (рис. 2). Это свидетельствует о том, что остаточные опухолевые клетки могут делать вклад в развитие СХ в КМ.

Факторы, влияющие на уровень химеризма. Так как уровень химеризма в КМ и ПК отличался, мы провели анализ, факторов, которые влияют на химеризм в КМ и ПК раздельно.

С более высоким уровнем донорского химеризма в ПК, т.е. меньшим количеством остаточных клеток реципиента на +30 день после аллотГСК в унивариантном анализе (табл. 2) были ассоциированы использование АТГ/ОКТ в кондиционировании ($p=0,018$), кондиционирование без ТВИ ($p=0,042$), высокая клеточность трансплантата ($p=0,051$), ремиссия 1 ($p=0,057$). В мультивариантном анализе только клеточность трансплантата ($p=0,006$) и номер ремиссии ($p=0,033$) оказывали влияние на уровень химеризма.

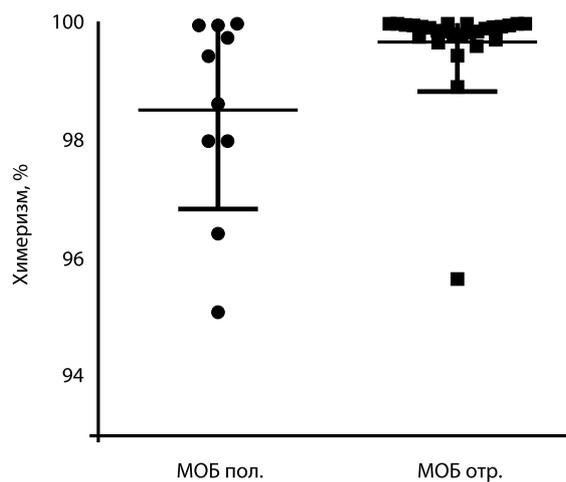


Рис. 2. Уровень химеризма в КМ на +30 день после аллотГСК в зависимости от наличия МОБ

С более высоким уровнем донорского химеризма в КМ на +30 день после аллотГСК в унивариантном анализе (табл. 2) были ассоциированы младший возраст реципиента ($p=0,012$), отсутствие котрансплантации МСК ($p=0,038$). В мультивариантном анализе (табл. 4) факторами, ассоциированными с развитием СХ, были низкая клеточность трансплантата ($p=0,015$) и старший возраст реципиента ($p=0,020$). Как в уни-, так и мультивариантном анализе общим фактором, влияющим на уровень химеризма и в КМ, и ПК, была клеточность трансплантата. Влияние других факторов на химеризм в КМ и ПК отличалось, это подчеркивает, что клеточный состав КМ и ПК отличается, и такие факторы, как возраст, кондиционирование, предшествующая терапия и др., по-разному могут оказывать влияние на процессы замещения клеток реципиента клетками донора.

В ряде других исследований также изучали факторы, которые обуславливают установление определенного уровня химеризма после аллотГСК. Эти факторы оказывают влияние или на иммунную компетентность реципиента (на реакцию «хозяин-против-трансплантата» – отторжение), или на иммунную компетентность клеток трансплантата (на реакцию «трансплантат-против-хозяина»), или на то и на другое [31].

В первую очередь фактором, влияющим на уровень химеризма, является интенсивность кондиционирования [19, 32, 33]. Полное замещение гемопоэза хозяина донорским, то есть развитие ПДХ, в большинстве случаев происходит после МАС, а персистенция остаточных клеток хозяина, то есть развитие СХ, чаще наблюдается после режимов сниженной интенсивности (reduced intensity conditioning, RIC) [33, 34]. В работе Wiedemann и соавторов [34] 92% пациентов достигли ПДХ (>99% донорских клеток) в первой точке исследования после МАС по сравнению с 54% после RIC ($p<0,001$). Считается, что мониторинг ДХ после МАС не представляет большого интереса, потому что приживление донорских клеток происходит быстро [35]. Поэтому основное внимание уделялось изучению факторов, влияющих на уровень химеризма после RIC, а не МАС. При RIC создаются более мягкие условия кондиционирования, и установление ПДХ больше зависит от реакции «трансплантат-против-хозяина», поэтому на достижение ПДХ оказывает влияние большее количество факторов.

В нашем исследовании все пациенты получили МАС, но сравнить в полной мере различные режимы кондиционирования между собой затруднительно, так как пациенты получили различную комбинацию и дозы миелоаблативных препаратов. В нашем исследовании применение ТВИ, АТГ/ОКТ при МАС не оказывало существенного влияния на уровень химеризма в мультивариантном анализе. В предыдущих исследованиях только для пациентов, получивших RIC, интенсивность кондиционирования влияла на уровень химеризма [19, 32, 33, 36, 37]. В частности, применение АТГ способствовало установлению ПДХ в Т-клеточной субпопуляции [36, 37] (в нашем исследовании применение АТГ влияло только в унивариантном анализе в ПК). С другой стороны при МАС эти факторы могут не играть важной роли, так как происходит полная абляция клеток реципиента.

Наши пациенты в первой ремиссии на момент аллотГСК достигали более высокого уровня донорского химеризма в ПК, чем в ремиссии 2 и более. Вероятно, это может быть связано с тем, что аллотГСК в первой ремиссии проводится в основном лицам с изначально неблагоприятным прогнозом или плохим ответом на первую линию химиотерапии, и поэтому они могут получать дополнительную и/или более интенсивную химиотерапию. В других исследованиях после RIC с более высоким уровнем химеризма было ассоциировано проведение интенсивной химиотерапии (миелосупрессивной) терапии или аутотрансплантации до ТГСК [28, 33, 38, 39],

Исход аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с острым лейкозом в зависимости от уровня химеризма на 30-й день

Таблица 2
Унивариантный анализ влияния факторов на уровень химеризма +30 дня у пациентов с ОЛ после МАС

Показатель	n	Химеризм в ПК		p	n	Химеризм в КМ		p
		Коэф. корреляции	Спирмена			Коэф. корреляции	Спирмена	
Возраст реципиента	62	-0,10		0,431	67	-0,32		0,007
Возраст донора	62	0,18		0,167	67	0,12		0,329
Клеточность трансплантата, 108/кг	62	0,25		0,051	67	0,31		0,012
CD34+ -клеточность трансплантата, 106/кг	60	-0,01		0,942	66	0,15		0,217
CD3+ -клеточность трансплантата, 106/кг	51	0,20		0,158	57	0,13		0,335
CD19+ -клеточность трансплантата, 106/кг	42	0,00		0,985	48	-0,02		0,870
Время между диагнозом и ТТСК	62	-0,11		0,406	67	-0,15		0,237
Лейкоциты до кондиционирования -7	62	-0,22		0,079	67	-0,02		0,886
Лейкоциты на день 0	62	-0,20		0,115	67	-0,13		0,297
		Медиана (интервал)				Медиана (интервал)		
Пол реципиента				0,568				0,984
мужской	37	99,97 (98,54–99,99)			43	99,92 (95,1–99,99)		
женский	25	99,93 (95,96–99,99)			24	99,91 (95,66–99,99)		
Пол донора				0,082				0,813
мужской	38	99,97 (98,27–99,99)			40	99,92 (95,1–99,99)		
женский	24	99,88 (95,96–99,99)			27	99,91 (96,43–99,99)		
Номер ремиссии				0,057				0,310
1	34	99,97 (98,27–99,99)			38	99,94 (98–99,99)		
≥2	28	99,91 (95,96–99,99)			29	99,88 (95,1–99,99)		
Источник стволовых клеток				0,937				0,605
КМ	45	99,96 (95,96–99,99)			49	99,92 (95,66–99,99)		
ПСК	17	99,92 (99,23–99,99)			18	99,87 (95,1–99,99)		
T-деплеция				0,509				0,727
да	6	99,82 (99,5–99,99)			7	99,88 (98,48–99,99)		
нет	56	99,96 (95,96–99,99)			60	99,92 (95,1–99,99)		
Котрансплантация МСК				0,472				0,038
да	6	99,82 (99,5–100)			7	99,86 (95,66–99,92)		
нет	56	99,96 (95,96–100)			60	99,94 (95,1–99,99)		
Использование ATG/ОКТ в кондиционировании				0,018				0,395
да	51	99,97 (95,96–99,99)			53	99,92 (95,1–99,99)		
нет	11	99,81 (98,27–99,98)			14	99,85 (98–99,99)		
Использование ТВ1 в кондиционировании				0,042				0,265
да	31	99,89 (95,96–99,99)			32	99,91 (95,1–99,99)		
нет	31	99,97 (99,5–99,99)			35	99,94 (95,66–99,99)		
HLA-совместимость				0,849				0,230
да	45	99,96 (95,96–99,99)			48	99,94 (95,1–99,99)		
нет	17	99,92 (99,67–99,99)			19	99,86 (95,66–99,99)		
Профилактика РТПХ				0,622				0,491
CNI (CSA/Тас)	17	99,94 (98,27–99,99)			21	99,95 (95,66–99,99)		
CNI (CSA/Тас)+MTX	39	99,96 (95,96–99,99)			41	99,92 (95,1–99,99)		
CNI (CSA/Тас)+MMF	6	99,95 (99,8–99,99)			5	99,85 (98,48–99,95)		
Тип донора				0,268				0,299
HLA-совместимый сиблинг	13	99,85 (98,27–99,98)			16	99,85 (98–99,99)		
HLA-совместимый неродственный	32	99,97 (95,96–99,99)			32	99,95 (95,1–99,99)		
HLA-несовместимый родственный	6	99,89 (99,8–99,99)			6	99,90 (99,61–99,99)		
HLA-несовместимый неродственный	11	99,96 (99,67–99,99)			13	99,83 (95,66–99,99)		
Диагноз				0,325				0,665
ОЛЛ	32	99,93 (95,96–99,99)			36	99,91 (95,1–99,99)		
ОМЛ	28	99,97 (99,5–99,99)			30	99,94 (95,66–99,99)		
ОЛ бифенотипич,	2	99,84 (99,69–99,99)			1	99,96		
Совместимость по полу (донор – девочка, реципиент – мальчик)				0,339				0,695
да	33	99,97 (95,96–99,99)			34	99,94 (95,1–99,99)		
донор – девочка, реципиент – мальчик	14	99,85 (98,54–99,99)			18	99,89 (98–99,99)		
донор – мужской, реципиент – донор	15	99,93 (98,27–99,99)			15	99,86 (95,66–99,99)		

Таблица 3
Мультивариантный анализ влияния факторов на уровень остаточных клеток реципиента в ПК у пациентов с ОЛ после МАС

Показатель	beta	p-value
Клеточность трансплантата, 10 ⁶ /кг	-0,092	0,006
Лейкоциты до кондиционирования -7	0,044	0,363
Пол донора (женский vs мужской)	0,264	0,091
Номер ремиссии (≥2 vs 1)	0,356	0,033
Использование АТГ/ОКТ в кондиционировании (да vs нет)	-0,326	0,119
Использование ТВИ в кондиционировании (да vs нет)	0,135	0,440

Таблица 4
Мультивариантный анализ влияния факторов на уровень остаточных клеток реципиентов КМ у пациентов с ОЛ после МАС

Показатель	beta	p-value
Возраст реципиента	0,029	0,010
Клеточность трансплантата, 10 ⁶ /кг	-0,074	0,020

а также более низкий уровень лимфоцитов перед аллоТГСК [22, 40]. После МАС на момент аллоТГСК у всех наших пациентов наблюдалась лейко- и лимфопения. По-видимому, после МАС степень лейкопении не оказывает значительного влияния на уровень химеризма.

Во многих исследованиях одним из наиболее важных факторов, влияющих на приживление донорских клеток, является состав трансплантата. Общая клеточность трансплантата [22, 35], доза CD34+ [20, 33, 35] коррелируют с общим уровнем химеризма в ранний посттрансплантационный период. Большое количество клеток, в том числе CD34+ клеток-предшественников и иммунных клеток (Т- и ЕК-клеток), в трансплантате способствуют установлению высокого уровня химеризма после RIC. В нашем исследовании у детей и молодых взрослых с ОЛ после МАС уровень химеризма зависел от общей клеточности трансплантата в уни- и мультивариантном анализе как в КМ, так и ПК.

Другим фактором, влияющим на химеризм, является источник стволовых клеток. В ряде исследований отмечено, что после трансплантации ПСК химеризм выше, чем при КМ [28, 32, 35]. Такой результат может быть связан с более высоким содержанием CD34+, моноцитов, а также Т-лимфоцитов и ЕК-клеток в ПСК трансплантате, которые ответственны за элиминацию остаточных клеток реципиента [41]. Даже после проведения Т-клеточной деплеции G-CSF-мобилизованные ПСК превосходят клетки КМ по уровню достижения полного химеризма [42]. Возможно, значимым фактором для развития полного химеризма является качество стволовых клеток, а не только количество Т-лимфоцитов. В других исследованиях разница в уровне химеризма среди КМ и ПСК не наблюдалась [33, 39]. В нашем исследовании после МАС источник стволовых клеток не оказывал влияния на уровень химеризма.

Деплеция Т-клеток трансплантата, с одной стороны, снижает риск развития РТПХ, с другой – повышает вероятность развития рецидивов, отторжения и приводит к более частому развитию смешанного химеризма [18], что связано с элиминацией зрелых Т-клеток, опосредующих эффект РТПХ и РТПЛ и ответственных за вытеснение остаточных клеток реципиента. Однако в нашем исследовании Т-деплеция не влияла на уровень химеризма.

HLA-совместимость во многом определяет толерантность между клетками донора и реципиента после RIC, поэтому более низкий уровень химеризма наблюдается при HLA-совместимой трансплантации, особенно от HLA-совместимого сиблинга, из-за

более слабого эффекта трансплантата против гемопоэза хозяина [27, 43]. Однако в других исследованиях при RIC [22, 33, 39], как и в нашем при MAC, HLA-совместимость не влияла на химеризм.

В нашем исследовании старший возраст был ассоциирован с развитием СХ в КМ. Такую находку можно объяснить, с одной стороны, тем, что гемопоэтические и стромальные клетки реципиента с возрастом могут быть более устойчивы к кондиционированию. С другой стороны, возраст реципиента может оказывать влияние на выбор кондиционирования, метаболизм химиопрепаратов и другие особенности, которые могут способствовать выживанию клеток реципиента. В двух других исследованиях после MAC, наоборот, у пациентов младшей возрастной группы чаще развивался СХ. В исследовании Leeuwen и соавторов [44] после MAC СХ чаще развивался у пациентов с онкогематологическими заболеваниями (ОГЗ) более молодого возраста ($p < 0,0001$), но они не анализировали КМ и ПК отдельно, и выборка была очень гетерогенной и маленькой. В другом исследовании при трансплантации пуповинной крови после MAC старший возраст реципиента был также ассоциирован с более высоким уровнем химеризма [43], однако группа включала пациентов со злокачественными и незлокачественными заболеваниями, что могло повлиять на результат (с незлокачественными заболеваниями пациенты, как правило, более младшего возраста, и приживление донорских клеток у них, соответственно, хуже). Однако в исследованиях с применением RIC не подтвердилось влияния возраста реципиента на уровень химеризма [19, 22, 25, 33, 36, 39]. Такая большая разница между RIC и MAC может быть обусловлена тем, что после RIC может оставаться значительное количество клеток реципиента вне зависимости от возраста реципиента. Кроме того, стоит учитывать тот факт, что RIC чаще применяется у взрослых и пожилых людей, особенно при лечении ОГЗ, и дети либо не включаются в эти исследования, либо составляют небольшую выборку.

Насколько стало известно, наше исследование является единственным, в котором проанализирована однородная выборка пациентов с ОЛ, получивших MAC, и в котором изучалось влияние различных факторов на уровень химеризма +30 дня отдельно для КМ и ПК, а также применялись чувствительные методы исследования, позволяющие исследовать низкий уровень СХ.

Влияние химеризма в ранний посттрансплантационный период на исход аллоТГСК. Среди 74 пациентов у 16 развился рецидив на 66–1203 (медиана 226) дни, из них 4 умерли в результате прогрессии лейкоза.

Исследование химеризма позволяет выделить пациентов с высоким риском развития рецидивов и низкой общей и безрецидивной выживаемостью. Кумулятивная частота развития рецидивов была значительно выше у пациентов со СХ ($\leq 99\%$) в КМ – $59,3 \pm 4,1\%$ по сравнению с пациентами с ПДХ – $17,24 \pm 0,29\%$, $p = 0,009$ (табл. 5, рис. 3). В то же время химеризм в ПК не оказывал воздействия. Среди других факторов, влияющих на частоту развития рецидивов у пациентов с ОЛ, были время между диагнозом и ТГСК (чем меньше, тем выше вероятность, $p = 0,007$) и наличие МОБ в КМ на +30 день ($p = 0,017$). В мультивариантном анализе (табл. 6) химеризм был наиболее значимым фактором развития рецидивов ($HR = 20,4$, $p < 0,001$). В связи с малым количеством пациентов с маркером МОБ данный показатель не включался в мультивариантный анализ. Из 9 пациентов со СХ в КМ на +30 день у 5 (55,6%) пациентов развился рецидив на 66–368 (медиана 130) дни после аллоТГСК, 2 – умерли в результате TRM (на +78 и +542 дни). Таким образом, удалось предсказать 5 (31,3%) из 16 рецидивов за 36–338 (медиана 100) дней до возврата заболевания.

Основной нашей задачей была оценка возможности предсказания ранних рецидивов (до +180 дня), которые, по литературным [10] и нашим данным, обладают наиболее неблагоприятным прогнозом. Пять (31,3%) из 16 рецидивов развились до +180 дня,

Таблица 5
Универсальный анализ влияния различных факторов на кумулятивную частоту развития рецидивов, кумулятивную частоту смертности, связанной с лечением (TRM), общую и безрецидивную выживаемость у пациентов с ОЛ после МАС

Переменные	Рецидив			TRM			RFS			OS		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Химеризм в ПК +30 день ($\leq 99\%$ vs $> 99\%$)	1,3	0,1–2,6	0,85	–	–	–	0,99	0,13–7,5	0,994	2,4	0,3–20,1	0,415
Химеризм в КМ +30 день ($\leq 99\%$ vs $> 99\%$)	4,5	1,4–13,9	0,009	2,7	0,6–13,1	0,21	5,1	2,1–12,4	<0,001	7	2,1–23	0,001
Возраст реципиента (на 1 год)	1	0,94–1,08	0,87	1,07	1,01–1,14	0,025	1,04	0,98–1,1	0,201	1,07	1,0–1,15	0,052
Возраст донора (на 1 год)	1,01	0,9–1,06	0,71	1,07	1,01–1,12	0,02	1,04	1,0–1,08	0,07	1,07	1,01–1,13	0,017
Клеточность трансплантата, $10^5/\text{кг}$	1	0,9–1,2	0,99	0,94	0,6–1,5	0,8	0,98	0,8–1,2	0,814	0,95	0,75–1,2	0,685
CD34+ клеточность трансплантата, $10^5/\text{кг}$	1,1	0,95–1,27	0,19	0,77	0,64–0,92	0,005	0,98	0,85–1,14	0,813	0,82	0,65–1,03	0,093
CD3+ клеточность трансплантата, $10^5/\text{кг}$	1	1,0–0,01	0,24	1	1,0–1,01	0,38	1	1,0–1,01	0,061	1	1,0–1,01	0,433
CD19+ клеточность трансплантата, $10^5/\text{кг}$	1,01	1–1,03	0,12	0,98	0,92–1,06	0,69	1	0,99–1,03	0,625	0,98	0,93–1,04	0,484
Время между диагнозом и аллотКСК (на 1 месяц)	0,97	0,95–0,99	0,007	1,01	0,99–1,03	0,24	0,99	0,98–1,01	0,294	1	0,98–1,02	0,777
Лейкоциты до кондиционирования –7	0,78	0,46–1,3	0,36	1,05	0,76–1,44	0,79	0,86	0,67–1,1	0,323	1,18	0,88–1,58	0,264
Лейкоциты на день 0	1,06	0,75–1,5	0,74	0,4	0,14–1,1	0,08	0,88	0,57–1,3	0,557	0,41	0,11–1,56	0,19
Пол реципиента												
женский vs мужской	2,1	0,8–5,42	0,13	1,1	0,27–4,8	0,86	1,8	0,81–4,1	0,144	1,9	0,6–5,9	0,27
Пол донора												
женский vs мужской	0,44	0,14–1,35	0,15	0,84	0,21–3,4	0,800	0,52	0,22–1,3	0,147	0,7	0,21–2,3	0,553
Совместимость по полу												
да	ref	0,1–1,9	0,260	2,8	0,5–15,8	0,250	0,9	0,3–2,6	0,806	1,4	0,3–6,3	0,662
донор – женский, реципиент – мужской	0,4	0,7–5,5	0,220	3,88	0,6–22,7	0,150	2,7	1,1–6,7	0,031	3,1	0,8–11,7	0,088
донор – мужской, реципиент – женский	1,9											
Номер ремиссии												
≥ 2 vs 1	0,9	0,3–2,5	0,900	1,3	0,3–4,9	0,750	1	0,46–2,3	0,954	0,9	0,3–2,88	0,842
Источник стволовых клеток												
ПСК vs КМ	2,1	0,8–5,5	0,130	2,5	0,5–9,9	0,190	2,6	1,1–5,7	0,023	2,7	0,9–8,5	0,080
T-деплеция												
да vs нет	1,1	0,26–4,9	0,860	2,5	0,5–11,5	0,240	1,7	0,6–5,2	0,313	2,6	0,7–9,6	0,153
Котрансплантация МСК												
да vs нет	0,4	0,05–3,5	0,410	1,2	0,1–10,7	0,880	0,6	0,14–2,6	0,497	1,6	0,35–7,4	0,542

Окончание таблицы	Рецидив			TRM			RFS			OS		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Режим кондиционирования с TBI vs без TBI	0,5	0,18–1,5	0,220	0,7	0,17–2,8	0,610	0,5	0,23–1,27	0,157	0,8	0,25–2,5	0,707
HLA-совместимость нет vs да	0,75	0,24–2,3	0,620	4,1	1–17	0,050	1,5	0,67–3,5	0,311	2,6	0,4–8,1	0,097
Донор родственный vs неродственный	1,26	0,45–3,5	0,660	0,9	0,21–3,6	0,850	1,1	0,48–2,6	0,850	1,1	0,33–3,6	0,900
Профилактика РТПХ												
CNI (CSA/Гас)	ref											
CNI (CSA/Гас) + MTX	1,1	0,38–3	0,9	0,6	0,14–2,8	0,53	0,86	0,36–2,1	0,74	0,71	0,2–2,5	0,597
CNI (CSA/Гас) + MMF	0,7	0,08–6,1	0,74	0,98	0,11–8,8	0,98	0,82	0,17–3,8	0,797	1,5	0,28–8,4	0,616
Тип донора												
HLA-совместимый сиблинг	ref											
HLA-совместимый неродственный	1,2	0,38–3,6	0,79	1	0,9–11,1	0,99	1,14	0,4–3,3	0,814	1	0,20–5,7	0,969
HLA-несовместимый неродственный	0,97	0,22–4,2	0,96	3,9	0,42–36,4	0,23	1,71	0,5–5,6	0,375	2,8	0,5–15,6	0,227
HLA-несовместимый родственный	0,59	0,07–4,6	0,61	4,6	0,44–47,6	0,2	1,59	0,4–6,7	0,529	2,4	0,3–16,8	0,391
Диагноз ОМП vs ОПЛ	1,4	0,5–3,9	0,49	1,2	0,3–4,6	0,82	1,4	0,6–3,2	0,422	1,2	0,4–3,7	0,749
МОБ в КМ на +30 день												
да vs нет	5,3	1,34–21	0,017	–	–	–	1,7	0,5–5,6	0,366	1,1	0,22–5,6	0,901

Таблица 6
Мультивариантный анализ влияния факторов на кумулятивную частоту развития рецидивов у пациентов с ОЛ после МАС

Переменные	HR	95% CI	p
Химеризм +30 КМ ($\leq 99\%$ vs $> 99\%$)	20,4	5,5–75,4	<0,001
Время между диагнозом и ТТСК (на 1 месяц)	0,94	0,91–0,98	0,001

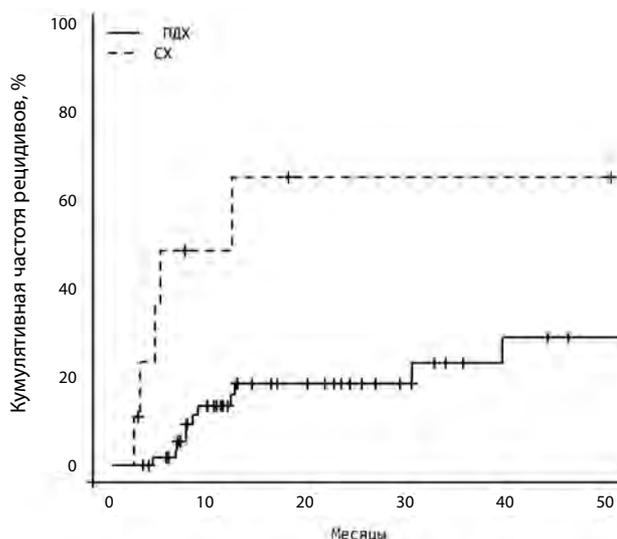


Рис. 3. Сравнение кумулятивной частоты рецидивов при различном уровне химеризма в КМ на +30 день. СХ ($\leq 99\%$), двухлетняя кумулятивная частота рецидивов $59,3 \pm 4,1\%$; ПДХ ($> 99\%$), двухлетняя кумулятивная частота рецидивов – $17,24 \pm 0,29\%$ ($p=0,009$)

4 пациента умерли в результате прогрессии и 1 пациент получил повторную аллоТГСК. Из 9 пациентов со СХ в КМ на +30 день, к +180 дню после аллоТГСК 4 находились в ремиссии, у 4 развился рецидив и 1 пациент умер в результате TRM на +78 день. Одному из этих 4 пациентов в ремиссии было проведено 4 инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ) к +180 дню по поводу СХ и положительной МОБ, после которых у него удалось достигнуть ПДХ и отрицательной МОБ; позже на +368 день у него развился рецидив. Кумулятивная частота развития рецидивов на +180 день составила $44,4 \pm 3,3\%$ для пациентов со СХ в КМ на +30 день и $1,72 \pm 0,03\%$ для пациентов с ПДХ. Суммарно у 4 (80%) из 5 пациентов с ранним рецидивом удалось его предсказать. Интересно, что некоторые пациенты со СХ в КМ на +30 день при последующем анализе достигли ПДХ в КМ и ПК, однако непосредственно перед рецидивом у них снова развился СХ.

Двухлетняя безрецидивная выживаемость (relapse free survival, RFS) составила $14,8 \pm 13,3\%$ для СХ на +30 день в КМ и $74,1 \pm 6,0\%$ для ПДХ, $p < 0,001$ (рис. 4). RFS на +180 день была $44,4 \pm 16,6\%$ для СХ и $91,4 \pm 3,7\%$ для ПДХ. Уровень химеризма в ПК не оказывал влияния на RFS (табл. 5). В мультивариантном анализе (табл. 7) уровень химеризма в КМ на +30 день оставался самым значимым фактором, влияющим на RFS (HR=10,7, $p < 0,001$).

Таблица 7
Мультивариантный анализ влияния факторов на безрецидивную выживаемость у пациентов с ОЛ после МАС

Переменные	HR	95% CI	p
Химеризм +30 КМ ($\leq 99\%$ vs $> 99\%$)	10,7	3,6–31,7	$< 0,001$
Возраст донора (на 1 год)	1,06	1,01–1,1	0,016
Совместимость по полу			
Да			
Донор – женский, реципиент – мужской	0,97	0,3–3,1	0,961
Донор – мужской, реципиент – женский	4,4	1,6–12	0,003
Источник стволовых клеток			
ПСК vs КМ	2,2	0,9–5,3	0,086

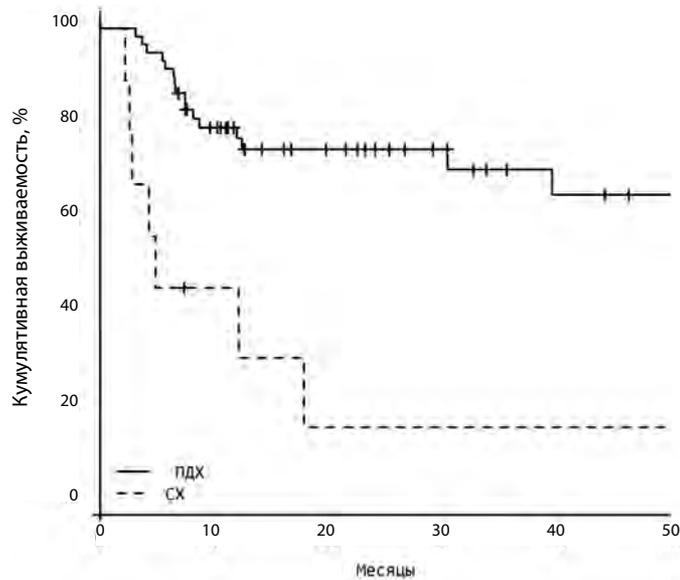


Рис. 4. Сравнение безрецидивной выживаемости при различном уровне химеризма в КМ на +30 день. СХ ($\leq 99\%$), двухлетняя безрецидивная выживаемость $14,8 \pm 13,3\%$; ПДХ ($> 99\%$), двухлетняя безрецидивная выживаемость $74,1 \pm 6,0\%$ ($p < 0,001$)

На кумулятивную частоту развития смертности, связанной с лечением (TRM), уровень химеризма в КМ и ПК не оказывал влияния (табл. 5).

Общая выживаемость была ниже у пациентов со СХ в КМ – $23,8 \pm 19,3\%$ по сравнению с пациентами с ПДХ – $89,7 \pm 4,0\%$, $p = 0,001$ (рис. 5). В мультивариантном анализе (табл. 8) на общую выживаемость влияли уровень химеризма в КМ на +30 день ($HR = 10,2$, $p < 0,001$) и возраст донора ($HR = 1,08$, $p = 0,008$).

Несомненным преимуществом мониторинга химеризма является то, что данное исследование применимо после всех аллоТГСК, в отличие от МОБ. Маркеры МОБ выявлялись только у 39 (52,7%) из 74 пациентов. Несмотря на то что положительная МОБ была у 5 из 7 пациентов со СХ по сравнению с 5 из 30 пациентов с ПДХ ($p = 0,009$), выявление СХ не эквивалентно выявлению МОБ, так как СХ может быть обусловлен наличием нормальных клеток. Например, СХ может быть переходным, если это результат остаточных Т-клеток реципиента, которые пережили кондиционирование. С другой стороны, наличие остаточных клеток хозяина может приводить к индукции толерантности и уменьшать РТПЛ. Развитие РТПЛ тесно связано с развитием РТПХ. У пациентов со СХ в КМ только у 1 из 9 была оРТПХ I–IV степени по сравнению с 27 из 64 с ПДХ ($p = 0,075$).

Ранние рецидивы характеризуются быстрой прогрессией и высокой смертностью, поэтому приоритетным является назначение упреждающей терапии и предотвращение рецидива. Мониторинг химеризма в КМ позволяет уже на +30 день выделить пациентов с высоким риском развития рецидива и назначить лечение.

Таблица 8
Мультивариантный анализ влияния факторов на общую выживаемость у пациентов с ОЛ после МАС (в модель включены только факторы с $p < 0,05$ из-за малого количества событий – 11 смертей)

Переменные	HR	95% CI	p
Химеризм +30 КМ $\leq 99\%$	10,2	2,9–36,1	$< 0,001$
Возраст донора (на 1 год)	1,08	1,02–1,15	0,008

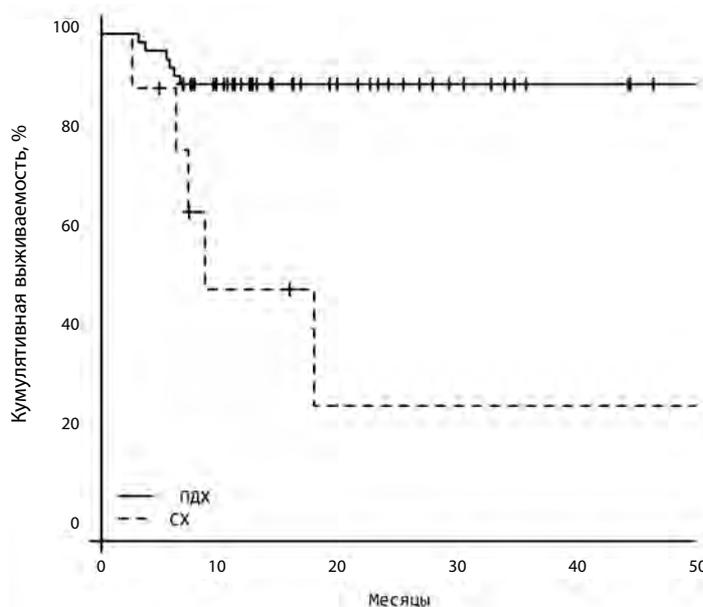


Рис. 5. Сравнение общей выживаемости при различном уровне химеризма в КМ на +30 день. СХ ($\leq 99\%$), двухлетняя общая выживаемость $23,8 \pm 19,3\%$; ПДХ ($> 99\%$), двухлетняя безрецидивная выживаемость $89,7 \pm 4,0$ ($p=0,001$)

Некоторые исследователи так же, как и мы, попытались оценить ассоциацию химеризма в ранний посттрансплантационный период с рецидивом. Imahashi с соавторами [19] на 80 взрослых с ОГЗ после RIC (флударабин/мелфалан) показал, что СХ ($< 95\%$) в любой клеточной субпопуляции на +14 день был ассоциирован с рецидивом. Напротив, Вагон с соавторами [45] у 282 пациентов с ОГЗ после RIC выявили значительную ассоциацию с развитием рецидивов только для химеризма ЕК-клеток на +14 день ($p=0,0009$), но не Т-лимфоцитов.

Lassaleta с соавторами [20] обнаружили, что у детей после трансплантации ПСК с ПДХ ($> 99\%$) на +30 день более низкая вероятность развития рецидива, чем у пациентов со СХ ($HR=4,98$). John Koreth с соавторами [21] на большой группе взрослых пациентов ($n=688$) с ОГЗ после RIC (флударабин/бисульфат), получивших преимущественно ПСК трансплантат от HLA-совместимого донора без Т-деплеции, показали, что общий химеризм $< 90\%$ и Т-клеточный химеризм $< 70\%$ на +30 и +100 дни был ассоциирован с увеличенным риском рецидивов и более низкой выживаемостью. Reshef с соавторами [22] у пациентов с ОГЗ после RIC (флударабин/бисульфат), получивших ПСК без Т-деплеции, также показали связь СХ в несортированных образцах и Т-клеточной субпопуляции на +30 день с развитием рецидивов. В исследовании Keil с соавторами [23] наблюдали более частое развитие рецидивов у пациентов с ОГЗ после RIC, у которых уровень Т-химеризма на +28 день был ниже 90%, при этом химеризм в CD33, гранулоцитах плохо коррелировал с развитием рецидивов. Напротив, в исследовании Besien с соавторами [27] у пациентов (взрослые и дети) с различными ОГЗ СХ ($< 95\%$) в Т-клетках на +30 день не коррелировал с рецидивом.

Таким образом, в некоторых исследованиях сообщалось [20–23, 46], что СХ на +30 день предшествует рецидиву, однако в большом количестве других исследований такой результат не подтвердился [24–28, 36, 39]. Такие различия в результатах могут быть обусловлены, с одной стороны, техническими аспектами: низкой чувствительностью STR-ПЦР, который использовался для мониторинга химеризма, выбором разных пороговых значений для СХ (95% и 99%), источником

клеток для анализа (ПК, КМ или сортированные клетки). С другой стороны, эти различия в результатах могли быть получены из-за гетерогенности режимов кондиционирования и заболеваний, включенных в исследование, а также использовании ИДЛ. Стоит отметить, большинство этих исследований проведены с помощью STR-ПЦР и/или FISH у пациентов после RIC, что может быть связано с более частым развитием СХ у этой группы пациентов, в то время как влияние СХ при MAC почти не изучено. Lamba с соавторами [24] не выявили связь между химеризмом на +30 день и рецидивом у пациентов (взрослые и дети) с ОГЗ и другими злокачественными заболеваниями, получившими MAC, что может быть связано как с большой разнородностью выборки, так и небольшой чувствительностью используемых методов. Нельзя исключить, что влияние СХ в ранний посттрансплантационный период будет отличаться в зависимости от режимов кондиционирования и типа заболевания.

В наше исследование мы включили только пациентов (дети и молодые взрослые) в ремиссии с ОЛ после первой аллотГСК. Насколько нам известно, это первое исследование с такой однородной выборкой. Мы показали, что СХ в КМ, но не ПК, влияет на развитие ранних рецидивов у данной группы пациентов.

В большинстве исследований влияния химеризма в ранний посттрансплантационный период использовали ПК и реже КМ, но ни в одном из них не проводилось сравнение этих двух источников клеток. Возможно, из-за того, что в части исследований использовалась ПК, а не КМ, не удалось выявить связь между химеризмом и развитием рецидивов. Здесь мы подчеркиваем большую прогностическую ценность исследования химеризма в КМ по сравнению с ПК. Некоторые исследователи также считают, что мониторинг в КМ при ОЛЛ, ОМЛ и МДС гораздо чувствительнее, чем ПК [13]. В исследовании динамики химеризма у взрослых пациентов с ОЛЛ определение химеризма в КМ позволяло выявлять риск рецидива на 2–3 месяца ранее, чем в ПК, и было более чувствительным (79% vs 55%, $p=0,06$) [13].

На данный момент не установлено единое пороговое значение для СХ на +30 день для предсказания рецидивов, что очень важно для принятия решения о назначении превентивной терапии. В некоторых исследованиях, показавших эффективность химеризма +30 дня в предсказании рецидивов, в качестве порога использовалось значение 99% [20], в других 90% [21] для несортированных образцов ПК и/или КМ; 70% [21], 90% [23] и 95% [27] для Т-клеточной субпопуляции; 90% [46] для CD34+-клеток. Только в единичных исследованиях анализировались различные пороговые значения химеризма. Для несортированной и Т-субпопуляции John Koreth с соавторами [21] исследовали пороговые значения с шагом 10%, не сообщая о влиянии низкого уровня СХ (90–99%). Reshef с соавторами [22] исследовали химеризм как непрерывную переменную и показали, что оптимальный порог для химеризма 96% для ПК и около 65% для Т-лимфоцитов. Возможно, использование более высокого порога (95%) для Т-клеточного химеризма, например, в исследовании Besien с соавторами [27], не позволило выявить связь между СХ в Т-клетках и рецидивом. Не исключено, что для разных режимов кондиционирования, разных заболеваний и для отдельных клеточных субпопуляций необходимо будет использовать разные пороговые значения. Как было показано в нашем исследовании, у детей с ОЛ при MAC необходимо использовать более чувствительные методы мониторинга химеризма, так как пороговое значение для СХ было 99%. Из-за редкого развития СХ после MAC нам не удалось оценить другие пороговые значения.

В некоторых работах исследовался химеризм в более отдаленных точках (+90, +120, +180 дни), и в них также находили более частое развитие рецидивов в группе со СХ [21, 24, 25, 36]. Следует отметить, при таком подходе исключаются пациенты, у которых развился рецидив к 100 дню, что еще раз подчеркивает необходимость

исследования химеризма в более ранних точках. Кроме того, в большинстве случаев после +30/60 дня можно отследить динамику химеризма, что может помочь стратифицировать пациентов на группы риска более точно. Так, Bautista и др. [47] у детей (n=91) с ОГЗ показали, что пациенты с увеличивающимся СХ в первые 100 дней после трансплантации имели повышенный риск рецидивов, в то время как исход пациентов с уменьшающимся СХ не отличался от ПДХ. Сходная тенденция была и в упомянутом выше исследовании Koreth с соавторами [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранние рецидивы при острых лейкозах после аллоТГСК характеризуются быстрой прогрессией и высокой смертностью. Мониторинг химеризма в КМ позволяет уже на +30 день выделить пациентов с высоким риском развития ранних рецидивов (в первые полгода) после аллоТГСК и дает возможность назначения упреждающей терапии и предотвращения рецидива. Перспективным является дальнейшее изучение возможности предотвращения развития рецидивов у пациентов со смешанным химеризмом на +30 день.

Исследование выполнено в рамках проекта БРФФИ № М16Р-126 (2016–2018 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Servais S., Beguin Y., Baron F. (2013) Emerging drugs for prevention of graft failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, vol. 18, no 2, pp. 173–192. doi:10.1517/14728214.2013.798642.
2. Tracey J., Zhang M.J., Thiel E., Sobocinski K.A., Eapen M. (2013) Transplantation Conditioning Regimens and Outcomes after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Children and Adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 19, no 2, pp. 255–259. doi:10.1016/j.bbmt.2012.09.019.
3. Majhail N.S., Brazauskas R., Hassebroek A., Bredeson C.N., Hahn T., Hale G.A., Horowitz M.M., Lazarus H.M., Maziarz R.T., Wood W.A., Parsons S.K., Joffe S., Rizzo J.D., Lee S.J., Hayes-Lattin B.M. (2012) Outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation for adolescent and young adults compared with children and older adults with acute myeloid leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 18, no 6, pp. 861–873. doi:10.1016/j.bbmt.2011.10.031.
4. Barrett A.J., Battiwalla M. (2010) Relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol.*, vol. 3, no 4, pp. 429–441. doi:10.1586/ehm.10.32.
5. Pasquini M., Zhu X. (2015) Current uses and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides, 2015. Available at: <http://www.cibmtr.org>.
6. Thanarajasingam G., Kim H.T., Cutler C., Ho V.T., Koreth J., Alyea E.P., Antin J.H., Soiffer R.J., Armand P. (2013) Outcome and Prognostic Factors for Patients Who Relapse After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 19, no 12, pp. 1713–1718. doi:10.1016/j.bbmt.2013.09.011.
7. Kongtim P., Di Stasi A., Rondon G., Chen J., Adekola K., Popat U., Oran B., Kebriaei P., Andersson B.S., Champlin R.E., Ciurea S.O. (2015) Can a female donor for a male recipient decrease the relapse rate for patients with acute myeloid leukemia treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 21, no 4, pp. 713–719. doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.018.
8. Savani B.N., Mielke S., Reddy N., Goodman S., Jagasia M., Rezvani K. (2009) Management of relapse after allo-SCT for AML and the role of second transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, vol. 44, no 12, pp. 769–777. doi:10.1038/bmt.2009.300.
9. Naik S., Martinez C., Leung K., Sasa G., Nguyen N.Y., Wu M.F., Gottschalk S., Brenner M., Heslop H., Krance R. (2015) Outcomes after Second Hematopoietic Stem Cell Transplantations in Pediatric Patients with Relapsed Hematological Malignancies. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 21, no 7, pp. 1266–1272. doi:10.1016/j.bbmt.2015.02.024.

10. Mielcarek M., Storer B.E., Flowers MED., Storb R., Sandmaier BM., Martin PJ. (2007) Outcomes among patients with recurrent high-risk hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 13, no 10, pp. 1160–1168. doi:10.1016/j.bbmt.2007.06.007.
11. de Lima M., Porter D.L., Battiwalla M., Bishop M.R., Giralto S.A., Hardy N.M., Kröger N., Wayne A.S., Schmid C. (2014) Proceedings from the National Cancer Institute's Second International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Hematopoietic Stem Cell Transplantation: part III. Prevention and treatment of relapse after allogeneic transplantati. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 20, no 1, pp. 4–13. doi:10.1016/j.bbmt.2013.08.012.
12. Rettinger E., Willasch A.M., Kreyenberg H., Borkhardt A., Holter W., Kremens B., Strahm B., Woessmann W., Mauz-Koerholz C., Gruhn B., Burdach S., Albert M.H., Schlegel P.G., Klingebiel T., Bader P. (2011) Preemptive immunotherapy in childhood acute myeloid leukemia for patients showing evidence of mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, vol. 118, no 20, pp. 5681–5688. doi:10.1182/blood-2011-04-348805.
13. Terwey T.H., Hemmati P.G., Nagy M., Pfeifer H., Gökbüget N., Brüggemann M., Le Duc TM., le Coutre P., Dörken B., Arnold R. (2014) Comparison of chimerism and minimal residual disease monitoring for relapse prediction after allogeneic stem cell transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 20, no 10, pp. 1522–1529. doi:10.1016/j.bbmt.2014.05.026.
14. Bacher U., Haferlach T., Fehse B., Schnittger S., Kröger N. (2011) Minimal residual disease diagnostics and chimerism in the post-transplant period in acute myeloid leukemia. *ScientificWorldJournal*, vol. 23, no 11, pp. 310–319. doi:10.1100/tsw.2011.16.
15. Clark J.R., Scott S.D., Jack A.L., Lee H., Mason J., Carter G.I., Pearce L., Jackson T., Clouston H., Sproul A., Keen L., Molloy K., Folarin N., Whitby L., Snowden JA., Reilly J.T., Barnett D. (2014) Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): technical recommendations for the use of short tandem repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group. *Br. J. Haematol.*, vol. 168, no 1, pp. 26–37. doi:10.1111/bjh.13073.
16. Lion T., Watzinger F., Preuner S., Kreyenberg H., Tilanus M., de Weger R., van Loon J., de Vries L., Cavé H., Acquaviva C., Lawler M., Crampe M., Serra A., Saglio B., Colnaghi F., Biondi A., van Dongen JJ., van der Burg M., Gonzalez M., Alcoceba M., Barbany G., Hermanson M., Roosnek E., Steward C., Harvey J., Frommlet F., Bader P. (2012) The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, vol. 26, no 8, pp. 1821–1828. doi:10.1038/leu.2012.66.
17. Bader P., Kreyenberg H., Hoelle W., Dueckers G., Kremens B., Dilloo D., Sykora KW., Niemeyer C., Reinhardt D., Vormoor J., Gruhn B., Lang P., Greil J., Handgretinger R., Niethammer D., Klingebiel T., Beck J.F. (2004) Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplant.*, vol. 33, no 8, pp. 815–821. doi:10.1038/sj.bmt.1704444.
18. Bader P., Kreyenberg H., Hoelle W., Dueckers G., Handgretinger R., Lang P., Kremens B., Dilloo D., Sykora K.W., Schrappe M., Niemeyer C., Von Stackelberg A., Gruhn B., Henze G., Greil J., Niethammer D., Dietz K., Beck J.F., Klingebiel T. (2004) Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J. Clin. Oncol.*, vol. 22, no 9, pp. 1696–1705. doi:10.1200/JCO.2004.05.198.
19. Imahashi N., Ohashi H., Terakura S., Miyao K., Sakemura R., Kato T., Sawa M., Yokohata E., Kurahashi S., Ozawa Y., Nishida T., Kiyoi H., Watamoto K., Kohno A., Kasai M., Kato C., Iida H., Naoe T., Miyamura K., Murata M. (2015) Chimerism status after unrelated donor bone marrow transplantation with fludarabine-melphalan conditioning is affected by the melphalan dose and is predictive of relapse. *Ann. Hematol.*, vol. 94, no 7, pp. 1139–1148. doi:10.1007/s00277-015-2312-4.
20. Lassaletta A., Ramírez M., Montero J.M., González-Vicent M., Balas A., Madero L., Diaz M.A. (2005) Full donor chimerism by day 30 after allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation is associated with a low risk of relapse in pediatric patients with hematological malignancies. *Leukemia*, vol. 19, no 4, pp. 504–506. doi:10.1038/sj.leu.2403692.

21. Koreth J., Kim H.T., Nikiforow S., Milford E.L., Armand P., Cutler C., Glotzbecker B., Ho V.T., Antin J.H., Soiffer R.J., Ritz J., Alyea E.P. 3rd. (2014) Donor chimerism early after reduced-intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse and survival. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 20, no 10, pp. 1516–1521. doi:10.1016/j.bbmt.2014.05.025.
22. Reshef R., Hexner E.O., Loren A.W., Frey N.V., Stadtmauer E.A., Luger S.M., Mangan J.K., Gill S.I., Vassilev P., Lafferty K.A., Smith J., Van Deerlin V.M., Mick R., Porter D.L. (2014) Early donor chimerism levels predict relapse and survival after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 20, no 11, pp. 1758–1766. doi:10.1016/j.bbmt.2014.07.003.
23. Keil F., Prinz E., Moser K., Mannhalter C., Kalhs P., Worel N., Rabitsch W., Schulenburg A., Mitterbauer M., Greinix H. (2003) Rapid establishment of long-term culture-initiating cells of donor origin after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, and significant prognostic impact of donor T-cell chimerism on stable engraftment and progression-free survival. *Transplantation*, vol. 76, no 1, pp. 230–236. doi: 10.1097/01.TP.0000071862.42835.76.
24. Lamba R., Abella E., Kukuruga D., Klein J., Savasan S., Abidi M.H., Mohamed A., Peres E. (2004) Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogeneic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. *Leukemia*, vol. 18, no 10, pp. 1681–1686. doi:10.1038/sj.leu.2403468.
25. Mohty M., Avinens O., Faucher C., Viens P., Blaise D., Eliaou JF. (2007) Predictive factors and impact of full donor T-cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, vol. 92, no 7, pp. 1004–1006.
26. Michaelis L., Lin S., Joseph L., Artz AS., Kline J., Pollyea D., Stock W., Rich E., Collins-Jones D., Casey B., Del Cerro P., van Besien K. (2007) Chimerism does not predict for outcome after alemtuzumab based conditioning. *Bone Marrow Transplant.*, vol. 40, no 2, pp. 181. doi:10.1038/sj.bmt.1705707.
27. van Besien K., Dew A., Lin S., Joseph L., Godley LA., Larson RA., Odenike T., Rich E., Stock W., Wickrema A., Artz AS. (2009) Patterns and kinetics of T-cell chimerism after allo transplant with alemtuzumab-based conditioning: mixed chimerism protects from GVHD, but does not portend disease recurrence. *Leuk. Lymphoma*, vol. 50, no 11, pp. 1809–1817. doi:10.3109/10428190903200790.
28. Baron F., Baker J.E., Storb R., Gooley T.A., Sandmaier B.M., Maris M.B., Maloney D.G., Heimfeld S., Oparin D., Zellmer E., Radich J.P., Grumet F.C., Blume K.G., Chauncey T.R., Little M.T. (2004) Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood*, vol. 104, no 8, pp. 2254–2262. doi:10.1182/blood-2004-04-1506.
29. Lavrinenko V.A., Savitskaya T.V., Volochnik Ye.V., Mareiko Yu.E., Aleynikova O.V. (2012) Quantitative analysis of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with molecular genetic methods. *Oncohematology*, vol. 2, pp. 29–36.
30. Meleshko A.N., Savva N.N., Fedasenko U.U., Romancova A.S., Krasko O.V., Eckert C., von Stackelberg A., Aleinikova O.V. (2011) Prognostic value of MRD-dynamics in childhood acute lymphoblastic leukemia treated according to the MB-2002/2008 protocols. *Leuk. Res.*, vol. 35, no 10, pp. 1312–1320. doi:10.1016/j.leukres.2011.04.013.
31. Baron F., Sandmaier B.M. (2006) Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia*, vol. 20, no 10, pp. 1690–1700. doi:10.1038/sj.leu.2404335.
32. Sugita J., Tanaka J., Hashimoto A., Shiratori S., Yasumoto A., Wakasa K., Kikuchi M., Shigematsu A., Miura Y., Tsutsumi Y., Kondo T., Asaka M., Imamura M. (2008) Influence of conditioning regimens and stem cell sources on donor-type chimerism early after stem cell transplantation. *Ann. Hematol.*, vol. 87, no 12, pp. 1003–1008. doi:10.1007/s00277-008-0542-4.
33. Mohr B., Koch R., Thiede C., Kroschinsky F., Ehninger G., Bornhäuser M. (2004) CD34+ cell dose, conditioning regimen and prior chemotherapy: factors with significant impact on the early kinetics of donor chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, vol. 34, no 11, pp. 949–954. doi:10.1038/sj.bmt.1704710.
34. Wiedemann B., Klyuchnikov E., Kröger N., Zabelina T., Stahl T., Zeschke S., Badbaran A., Ayuk F., Alchalby H., Wolschke C., Bokemeyer C., Fehse B., Zander AR., Bacher U. (2010) Chimerism studies with quantitative real-time PCR in stem cell recipients with acute myeloid leukemia. *Exp. Hematol.*, vol. 38, no 12, pp. 1261–1271. doi:10.1016/j.exphem.2010.08.006.

35. Mickelson D.M., Sproat L., Dean R., Sobecks R., Rybicki L., Kalaycio M., Pohlman B., Sweetenham J., Andresen S., Bolwell B., Copelan E.A. (2011) Comparison of donor chimerism following myeloablative and nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.*, vol. 46, no 1, pp. 84–89. doi:10.1038/bmt.2010.55.
36. El-Cheikh J., Vazquez A., Crocchiolo R., Furst S., Calmels B., Castagna L., Lemarie C., Granata A., Ladaique P., Oudin C., Faucher C., Chabannon C., Blaise D. (2012) Acute GVHD is a strong predictor of full donor CD3+ T cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Am. J. Hematol.*, vol. 87, no 12, pp. 1074–1078. doi:10.1002/ajh.23319.
37. Nakai K., Mineishi S., Kami M., Saito T., Hori A., Kojima R., Imataki O., Hamaki T., Yoshihara S., Ohnishi M., Kim SW., Ando T., Fumitoh A., Kanda Y., Makimoto A., Tanosaki R., Kanai S., Heike Y., Ohnishi T., Kawano Y., Wakasugi H., Takaue Y. (2003) Antithymocyte globulin affects the occurrence of acute and chronic graft-versus-host disease after a reduced-intensity conditioning regimen by modulating mixed chimerism induction and immune reconstitution. *Transplantation*, vol. 75, no 12, pp. 2135–2143. doi:10.1097/01.tp.0000066453.32263.f7.
38. Valcárcel D., Martino R., Caballero D., Mateos M.V., Pérez-Simón J.A., Canals C., Fernández F., Bargay J., Muñoz-Díaz E., Gonzalez M., San Miguel JF, Sierra J. (2003) Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.*, vol. 31, no 5, pp. 387–392. doi:10.1038/sj.bmt.1703846.
39. Saito B., Fukuda T., Yokoyama H., Kurosawa S., Takahashi T., Fuji S., Takahashi N., Tajima K., Kim SW., Mori S., Tanosaki R., Takaue Y., Heike Y. (2008) Impact of T cell chimerism on clinical outcome in 117 patients who underwent allogeneic stem cell transplantation with a busulfan-containing reduced-intensity conditioning regimen. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 14, no 10, pp. 1148–1155. doi:10.1016/j.bbmt.2008.07.013.
40. Salit R.B., Fowler D.H., Dean R.M., Pavletic S.Z., Hakim F.T., Steinberg S.M., Hardy N.T., Sportes C., Gress R.E., Bishop M.R. (2013) Host lymphocyte depletion as a strategy to facilitate early full donor chimerism after reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 19, no 10, pp. 1509–1513. doi:10.1016/j.bbmt.2013.08.001.
41. Storek J., Dawson M.A., Storer B., Stevens-Ayers T., Maloney D.G., Marr K.A., Witherspoon R.P., Bensinger W., Flowers M.E., Martin P., Storb R., Appelbaum F.R., Boeckh M. (2001) Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*, vol. 97, no 11, pp. 3380–99889.
42. Wiesneth M., Schreiner T., Bunjes D., Bischof C., Erne E., Maccari B., Kubanek B. (1999) Comparison of T-cell-depleted BMT and PBPC with respect to chimerism, graft rejection, and leukemic relapse. *J. Hematother.*, vol. 8, no 3, pp. 269–274. doi:10.1089/106161299320299.
43. Elkaim E., Picard C., Galambrun C., Barlogis V., Loundou A., Curtillet C., Oudin C., Thuret I., Chambost H., Michel G. (2014) Peripheral blood cells chimerism after unrelated cord blood transplantation in children: kinetics, predictive factors and impact on post-transplant outcome. *Br. J. Haematol.*, vol. 166, no 4, pp. 557–565. doi:10.1111/bjh.12918.
44. van Leeuwen J.E., van Tol M.J., Joosten A.M., Wijnen J.T., Verweij P.J., Khan P.M., Vossen J.M. (1994) Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood*, vol. 83, no 10, pp. 3059–3067.
45. Baron F., Petersdorf E.W., Gooley T., Sandmaier B.M., Malkki M., Chauncey T.R., Maloney D.G., Storb R. (2009) What is the role for donor NK cells after nonmyeloablative conditioning? *Biol. Blood Marrow Transplant.*, vol. 15, no 5, pp. 580–588. doi:10.1016/j.bbmt.2009.01.018.
46. Lange T., Hubmann M., Burkhardt R., Franke GN., Cross M., Scholz M., Leiblein S., Al-Ali H.K., Edelmann J., Thiery J., Niederwieser D. (2011) Monitoring of WT1 expression in PB and CD34+ donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia*, vol. 25, no 3, pp. 498–505. doi:10.1038/leu.2010.283.
47. Bautista F., Moreno L., Fernández-Navarro J.M., Senent L., Andrés M.M., Castel V., Verdeguer A. (2011) Evaluation of chimerism by quantitative PCR analysis of DNA polymorphism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a pediatric population with malignancies. *Pediatr. Transplant.*, vol. 15, no 1, pp. 81–87. doi:10.1111/j.1399-3046.2010.01416.x.

Поступила/Received:
Контакты/Contacts: lavrinenkovictoria@gmail.com

УДК 577.213.32-018:616.15]-07:577.21

Стёганцева М.В., Гурьянова И.Е., Сакович И.С., Полякова Е.А., Белевцев М.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Stegantseva M., Guryanova I., Sakovich I., Polyakova E., Belevtsev M.
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Метод количественного определения кольцевых молекул ДНК Т- и В-клеточного рецептора, TREC и KREC, в периферической крови с использованием ПЦР в реальном времени

Method of quantitative assay of circular molecules of T- and B-cell
receptor, TREC and KREC, in peripheral blood by real-time PCR

Резюме

Содержание продуктов реаранжировки Т- и В-клеточного рецептора, TREC и KREC соответственно, в периферической крови может служить суррогатным маркером эффективности функционирования иммунной системы, т.к. данные молекулы образуются в результате формирования антиген-распознающего рецептора. Существует множество методик детекции молекул TREC и KREC в периферической крови. В данной статье мы предлагаем метод количественной оценки данных молекул методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, т.к. это один из наиболее простых и чувствительных методов, используемых в диагностике. На основе исследования здоровых детей мы определили референсные значения содержания TREC и KREC в периферической крови и определили данные показатели у пациентов с генетически подтвержденным первичным иммунодефицитом.

Ключевые слова: Т- и В-клеточный рецептор, TREC, KREC, ПЦР в реальном времени, первичный иммунодефицит.

Abstract

The content of the byproducts of the T- and B-cell receptors rearrangements, TREC and KREC respectively, in the peripheral blood can serve as a surrogate marker of the effective functioning of the immune system, because these molecules are the result of the antigen-recognizing receptor formation. There are many methods for detecting TREC and KREC molecules in peripheral blood. In this article we propose a method for the quantitative analysis of these molecules by the real-time polymerase chain reaction, due to its simplicity and sensitivity for diagnosis. We determined the reference values of TREC and KREC content in peripheral blood based on the study of healthy children and we determined these parameters in patients with genetically confirmed primary immunodeficiency.

Keywords: T- and B-cell receptor, TREC, KREC, real-time PCR, primary immunodeficiency.

ВВЕДЕНИЕ

Количество кольцевых молекул ДНК Т- и В-клеточного рецептора, TREC и KREC (от англ. "T-cell receptor excision circles" и "kappa-deleting recombination excision circles"), или как их еще называют эксцизионных колец, позволяет оценить эффективность генерации лимфоцитов и пополнение пула периферических клеток со сформированным антигенраспознающим рецептором. В основе данного феномена лежит то, что TREC и KREC образуются на стадии ранних предшественников лимфоцитов в процессе реаранжировки уникального Т- и В-клеточного рецептора в тимусе и костном мозге соответственно [1].

Молекулы TREC образуются при формировании только $\alpha\beta$ -Т-лимфоцитов, которые составляют около 70% от общего пула Т-клеток [2]. Это обусловлено особенностью расположения генных сегментов TCR (от англ. T-cellreceptor): δ -цепь находится внутри α -цепи, поэтому для успешной перестройки последней, δ -цепь должна быть удалена в процессе перестройки генов TCR. Вырезание δ -цепи происходит на границе таких структурных элементов как δ Rec- ψ Ja, с последующим лигированием концевых участков фрагмента. Образовавшаяся кольцевая молекула носит одноименное название δ Rec- ψ Ja TREC или сигнальный TREC, т.к. включает сигнальные элементы распознавания для рекомбиназ. На самом деле, в процессе реаранжировки генов $\alpha\beta$ TCR образуется несколько побочных продуктов в виде эписомальной ДНК, однако только δ Rec- ψ Ja TREC представляет исследовательский и диагностический интерес, т.к. данная молекула появляется на финальной стадии формирования рецептора и свидетельствует о полном и успешном завершении данного процесса [3]. Молекулы TREC не реплицируются в процессе клеточного деления, в результате чего TREC остается только в одной из дочерних клеток. Это приводит к постепенному разведению TREC-позитивных клеток на периферии. Максимум две молекулы TREC могут находиться в одном $\alpha\beta$ Т-лимфоците при условии, что реаранжировка произошла в обоих аллелях и клетка еще не пролиферировала [4]. Показано, что молекулы δ Rec- ψ Ja TREC содержатся только в ранних тимических мигрантах (RTE, от англ. recent thymic emigrants) и наивных Т-лимфоцитах с фенотипом CD3+CD45RA+, таким образом, они способны предоставить информацию об эффективности генерации Т-лимфоцитов. В связи с этим, количественное определение TREC-позитивных клеток в периферической крови может быть использовано для широкого спектра диагностических процедур: диагностика первичных и вторичных иммунодефицитов, мониторинг восстановления лимфоцитарного пула после химиотерапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, оценка эффективности антиретровирусной терапии и др. [5–8].

В свою очередь, молекулы KREC образуются на поздних стадиях созревания В-лимфоцитов и представляют собой продукты рекомбинации, определяющей аллельное и изотипическое исключение Ig-каппа (IGK) локуса. Они образуются в тех В-лимфоцитах, которые после успешной перестройки тяжелой цепи, не прошли продуктивной перестройки IGK в одном или обоих аллелях. Это происходит из-за рекомбинации делетирующего элемента IGK (IGKDEL) с сигнальной последовательностью рекомбинации (RSS), расположенным в IGKJ-IGK-интроне (интрон RSS), в результате которой формируется кодирующее соединение, препятствующее дальнейшим перестройкам IGK-локуса. Благодаря ключевому

событию, лежащему в основе образования KREC, данная молекула и получила свое название “kappa-deleting recombination excision circles” [9]. Молекулы KREC обладают теми же характеристиками, что и TREC, и соответственно, могут быть использованы для диагностики иммунопатологических состояний, связанных с дефицитом В-лимфоцитов и нарушением процесса формирования функционального рецептора [10].

Существует множество методик детекции молекул TREC и KREC в периферической крови. В свою очередь, мы в данной статье предлагаем метод количественной оценки молекул TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, т.к. это один из наиболее простых и чувствительных методов, используемых в диагностике. На основе исследования здоровых детей мы определили референсные значения содержания TREC и KREC в периферической крови и определили данные показатели у пациентов с генетически подтвержденным первичным иммунодефицитом.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получить количественные стандарты для фрагментов молекул TREC и KREC и разработать лабораторный метод для их количественной оценки в образцах периферической крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования послужила периферическая кровь 53 здоровых доноров в возрасте от 1 дня до 15 лет (медиана возраста 9 лет). Из них 36 детей в возрасте от 3 до 15 лет (медиана – 11 лет), из которых 21 девочка и 15 мальчиков. Все доноры прошли диспансерное обследование на базе Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии. Были проведены биохимический и общий анализы крови, иммунограмма и осмотр педиатра. 17 новорожденных проходили первичный осмотр на базе РНПЦ «Мать и дитя». Также в исследовании приняли участие 18 пациентов с различными ПИД. Все исследования были проведены в рамках научно-исследовательской темы при согласовании с этическим комитетом и официальном согласии родителей или опекунов доноров.

Клетки периферической крови выделяли методом лизиса в RCLB буфере. ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. ДНК из «сухих пятен» крови выделяли из диска диаметром 3 мм методом фенол-хлороформной экстракции и наборами QiaAmp DNA MicroKit (Qiagen, USA) и Pure Link Genomic DNA MiniKit (Thermo Fisher Scientific, USA) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрация выделенной ДНК измерялась на спектрофотометре NanoDrop и Qubit.

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови проводили с использованием проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, UK) в соответствии со стандартной диагностической панелью: CD3+, CD3+HLA-DR+, CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD19+, CD16+CD56+, CD3+CD16+CD56+, CD3+CD4+RA+, CD3+CD8+RA+. Дополнительно определяли количество ранних тимических мигрантов (RTE) CD4+RA+CD31+. Использовали моноклональные антитела Xbio (Чехия).

ПЦР в режиме реального времени проводилась на базе амплификатора Bio-Rad CFX-96 (Bio-Rad, США) при поддержке программного обеспечения Real-time CFX Manager Software. В качестве контрольного гена использовали альбумин. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл и включал TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, США),

воду и сток праймеров с концентрацией 6 пмоль для прямого и обратного праймеров и 4 пмоль для гидролизующей пробы. Постановка осуществлялась в дублях.

Статистический анализ данных проводили на базе программы Statistica 8.0. Достоверность статистических различий определяли с помощью Mann – Whitney U-test.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Праймеры и стандартизация условий ПЦР в реальном времени

Праймеры для контрольного гена и фрагментов ДНК TREC и KREC подбирали с помощью программы Primer3Plus (<http://www.primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Последовательности и характеристики праймеров представлены в табл. 1. Размер продукта для альбумина составляет 118 нуклеотидов (NG_009291.1), для TRE – 125 и 121 для KREC. Прямой праймер для TREC располагается в локусе TCRA/TCRD на 14 хромосоме (NG_001332.3, AE000521.1), а обратный праймер и проба в том же локусе, но отстоит на несколько тысяч пар нуклеотидов (AE000521.1). Однако за счет реаранжировки генных сегментов эти фрагменты оказываются рядом друг с другом, что позволяет их амплификацию.

Праймеры на KREC расположены в локусе каппа-цепи иммуноглобулина на 2 хромосоме (NG_000834.1). Прямой праймер расположен в J(k)-C(k) интроне (X03958.1). Обратный праймер и проба для фрагмента KREC расположены в середине каппа дилатирующего элемента Kde на второй хромосоме (X03957.1).

Таблица 1
Праймеры для ПЦР в режиме реального времени

Название	Последовательность 5'-3'	Размер	Т. отжига	Место посадки
ALB_Forward	TGAACAGGCGACCATGCTT	19	59.9	12 экзон (18922–18940)
ALB_Reverse	CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT	26	60.6	12 экзон (19039–19014)
ALB_Probe	FAM-TGCTGAAACATTTCACCTTCCATGCAGA-BHQ1	27	59.2	12 экзон (18986–19012)
sjTREC_Forward	CCATGCTGACACCTCTGGTT	21	60.0	TCRA/TCRD (853369–853388)
sjTREC_Reverse	CTTCATTACCGTTCTCACGA	21	58.3	TCRA/TCRD (765009–764989)
sjTREC_Probe	FAM-CACGGTGATGCATAGGCACCTGC-BHQ1	23	60.4	TCRA/TCRD (764923–764945)
sjKREC_Forward	TCAGCGCCATTACGTTTCT	20	60.0	J(k)-C(k) intron(443–462)
sjKREC_Reverse	GTGAGGGACACGCAGCC	17	60.4	Kde (485–469)
sjKREC_Probe	FAM-CCAGCTCTTACCCTAGAGTTTCTGCACGG-BHQ1	29	62.0	Kde (504–532)

Получение стандартов плазмидных векторов

Для создания стандартов плазмидных векторов было проведено молекулярное клонирование амплифицированных фрагментов TREC, KREC и контрольного гена альбумин в плазмидный вектор pTZ57R/T. Предварительно ПЦР-продукт разгоняли в агарозном геле (1,5%), а затем очищали набором QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию очищенного

продукта измеряли методом электрофореза в 2%-м агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Лигирование проводили с использованием набора Rapid DNA Ligation & Transformation Kit (Fermentas) согласно прилагаемой инструкции в общем объеме 10 мкл. Соотношение концентраций вставка/вектор определяли с помощью программы Ligation Calculator. Реакция лигирования протекала при +4 °С.

Трансформацию проводили кальций-холодовым методом. В качестве компетентных клеток использовали штамм XL1-Blue бактерии *E. coli*. Для селекции трансформированных клонов использовали ампициллин. После трансформации клетки культивировали 18 часов в термостате при 37 °С. Плазмиды, выделенные из трансформированной культуры *E. coli*, секвенировали и определяли их аутентичность. Плазмиды из клеток выделяли с использованием набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, США). Выделенные плазмиды линеаризовали посредством рестрикции с *EcoRI*. Реакция протекала при 37 °С в течение 30 минут в объеме 10 мкл.

Концентрацию плазмид определяли на Qubit. Используя полученную концентрацию (нг/мкл) и размер молекулы (пары оснований) определяли количество копий в мкл раствора при помощи “Calculator for determining the number of copies of a template” (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). Затем готовили серийные разведения линеаризованной плазмидной ДНК, содержащей соответствующие вставки с шагом в 10 раз (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5).

Стандартные разведения проверяли методом ПЦР в реальном времени (рис. 1). Характеристики калибровочных кривых удовлетворяют принятым стандартам для данного метода. Эффективность реакции составила 87,7%, коэффициент корреляции (R^2) – 0,964, наклон калибровочной кривой – «-» 3,657, y-intercept – 38,705.

Специфичность и чувствительность метода

Специфичность метода определяли путем амплификации ДНК выделенной из клеточных линий не лимфоцитарной природы: НЕК 293Т, HL60, K562. Ни в одной из перечисленных клеточных линий амплификация не наблюдалась. Специфичность метода составляет 100%. Чувствительность метода определялась путем разведения образца с известным количеством TREC и KREC в клетках донора и составила 10^{-5} .

Результаты экспериментов по воспроизводимости метода внутри одной серии (N=20) и между сериями (N=10) приведены в табл. 2.

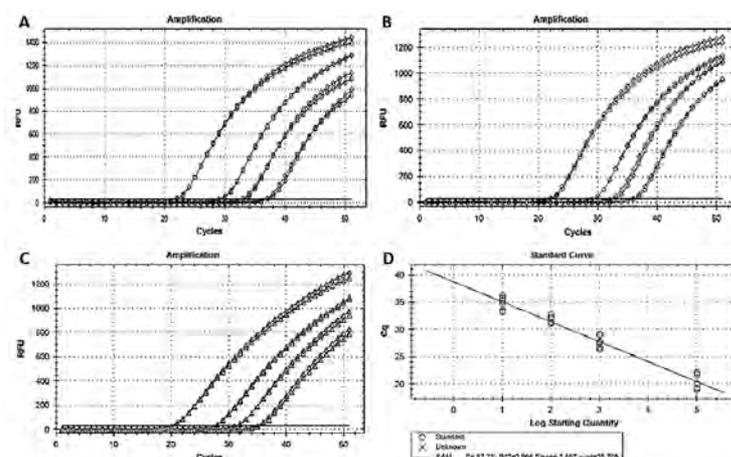


Рис. 1. Амплификационные кривые стандартных разведений контрольного гена альбумин (А), TREC (В), KREC (С) и калибровочная кривая совместной постановки (D)

Таблица 2
Воспроизводимость и сходимость результатов

		ALB		TREC		KREC	
		Ct	Число копий	Ct	Число копий	Ct	Число копий
Сходимость	Среднее значение	21,7	8,35×10 ⁴	31	1,08×10 ²	32,5	1,11×10 ²
	Коэффициент вариации, %	1,0	12,6	0,9	17,5	0,9	17,6
Воспроизводимость	Среднее значение	22,4	1×10 ⁵	32,9	2,14×10 ¹	33,9	3,59×10 ¹
	Коэффициент вариации, %	3,4	11,3	3,2	26,4	3,0	11,7

Самый большой разброс данных наблюдается в межсерийных повторах определения молекул TREC и составляет 26,4%. Данный результат является приемлемым, т.к. при использовании ПЦР в реальном времени допускается вариация результатов до 100% при низких концентрациях ДНК.

Количественный анализ молекул TREC и KREC проводили по формуле:

$$\frac{\text{Количество копий мишени}}{\text{Количество копий альбумина}/2} \times 10^6$$

Определение референсных значений TREC и KREC у здоровых людей

В исследовании приняли участие 53 донора периферической крови в возрасте от 1 дня до 15 лет (медиана возраста 9 лет). Ни у кого из доноров не было зафиксировано текущих инфекционных заболеваний на момент обследования. Показатели иммунограммы, биохимического и общего анализов крови находились в пределах нормы. Семнадцать новорожденных от 1 до 4 дней с момента рождения проходили первичное обследование на базе Республиканского научно-практического центра «Мать и дитя» (под руководством к.м.н. Гнедько Т.В.). Все младенцы родились доношенными (38–40 недель) с весом от 3000 до 4100 г. Состояние рефлексов не менее 7 по шкале Апгар. По результатам иммунограммы наблюдается сравнительно небольшой разброс в количестве лейкоцитов. Значения клеточных субпопуляций в пределах нормы.

По результатам проведенных исследований установлен диапазон значений TREC и KREC для новорожденных и детей старшей возрастной категории (рис. 2). Показатели у детей первых 4 дней жизни достоверно выше, чем у детей более старшей возрастной категории (p<0,001). В связи с этим, диапазон нормальных значений для данных групп детей выставлялся отдельно (табл. 3).

Таблица 3
Диапазон нормальных значений TREC и KREC

	TREC		KREC	
	Новорожденные	3–15 лет	Новорожденные	3–15 лет
На 10 ⁶ МНК	3,34×10 ⁴ –4,5×10 ⁵	4,07×10 ³ –4,5×10 ⁵	1,55×10 ⁴ –2,99×10 ⁵	1,78×10 ³ –2,99×10 ⁵

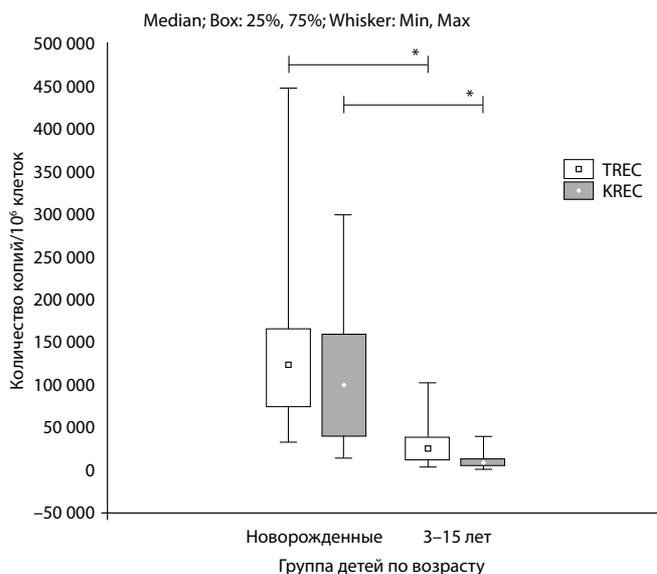


Рис. 2. Количество копий TREC и KREC в периферической крови детей различных возрастных категорий

Примечание:
* $p < 0,001$.

Определение TREC и KREC у пациентов с первичным иммунодефицитом

В качестве тестирования метода исследовали группу из 18 пациентов с заведомо известными, генетически подтвержденными, нарушениями Т- и/или В-клеточного звена иммунитета. С диагнозом тяжелый комбинированный иммунодефицит

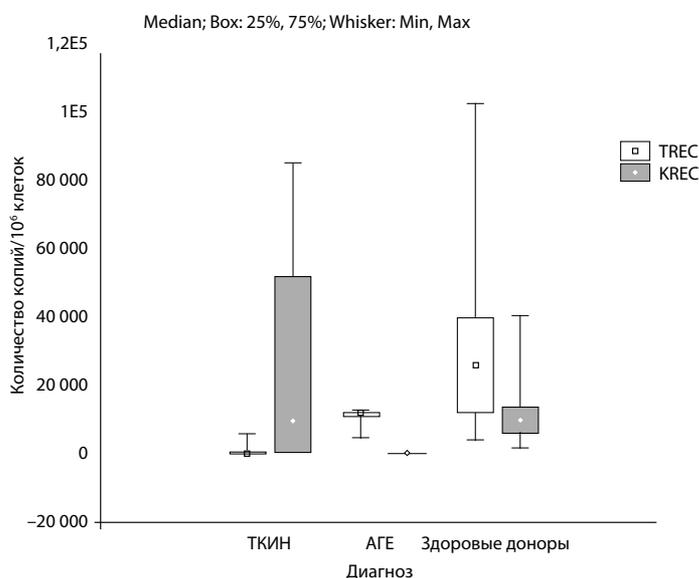


Рис. 3. Содержание TREC и KREC у пациентов с генетически подтвержденным ПИД

Примечания: ТКИН – тяжелый комбинированный иммунодефицит, АГЕ – агаммаглобулинемия.

(ТКИН) с фенотипом T-B+NK+ проанализировано 12 пациентов. Среди них 6 пациентов имели мутацию в гене IL7R, 1 пациент – в гене IL2R, 3 пациента – в гене JAK3 и 2 пациента с мутацией в гене RAG1. Исследовано 6 пациентов с диагнозом агаммаглобулинемия (АГЕ) с мутацией в гене ВТК.

По результатам количественного анализа у пациентов с ТКИН наблюдалось отсутствие, либо значительное снижение копий TREC, в то время как значения KREC находились в пределах установленной нормы (рис. 3). Только один пациент из 12 имел полное отсутствие молекул KREC, что свидетельствует о нарушении B-клеточного звена в дополнение к T-звену. У всех пациентов с агаммаглобулинемией отмечался нормальный уровень значений TREC, сопоставимый с контролем, и полное отсутствие, либо следовые количества молекул KREC.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью, а созданные стандарты характеризуются высокой стабильностью и воспроизводимостью, необходимыми для их клинического применения. Метод может применяться для детекции молекул TREC и KREC как в образцах цельной периферической крови, так и с «сухих пятен». Вычисленный диапазон значений TREC и KREC у здоровых детей может использоваться в качестве диагностических границ при лабораторном исследовании на наличие дефекта T- и B-клеточного звеньев иммунитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zelm M.C., Burg M., Langerak A.W. (2011) PID comes full circles: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Frontiers in immunology*, vol. 2, no 12, pp. 1–7.
2. Puck J.M. (2012) Laboratory technology for population-based screening for severe combined immunodeficiency in neonates: The winner is T-cell receptor excision circles. *J Allergy Clin Immunol*, no 129, pp. 607–616.
3. Verbsky J., Thakar M., Routes J. (2012) The Wisconsin approach to newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, vol. 129, no 3, pp. 622–627.
4. Geenen V., Poulin J.-F., Dion M.L. (2003) Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *Journal of Endocrinology*, no 176, pp. 305–311.
5. Hazenberg M.D., Otto S.A., Pauw E.S. (2002) T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood journal*, vol. 99, no 9, pp. 3449–3453.
6. Svaldi M., Lanthaler A.J., Dugas M. (2003) T-cell receptor excision circles: a novel prognostic parameter for the outcome of transplantation in multiple myeloma patients. *British J Haematology*, no 122, pp. 795–801.
7. Borghans J.A., Bredius R.G., Hazenberg M.D. (2006) Early determination of long-term T-cell reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency. *Blood*, vol. 108, no 2, pp. 763–769.
8. Chavan S., Bennuri B., Kharbanda M. (2001) Evaluation of T cell receptor gene rearrangement excision circles after antiretroviral therapy in children infected with human immunodeficiency virus. *J Infectious Disease*, no 183, pp. 1445–1454.
9. Serana F., Chiarini M., Zanotti C. (2013) Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *Journal of translational medicine*, vol. 11, no 119, pp. 1–11.
10. Zelm M.C., Szczepanski T., Burg M. (2006) Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B-cell expansion. *The Journal of experimental medicine*, vol. 204, no 3, pp. 645–655.

Поступила/Received: 10.08.2017

Контакты/Contacts: stsegantsevam@gmail.com

УДК 616-006.66

Антонов Е.А.
Медицинский центр «Кибер Клиника Спиженко», Киев, Украина

Antonov E.
Medical Center "Cyber Clinic Spizhenko", Kyiv, Ukraine

Гипоксия и прогрессирование рака желудка

Hypoxia and progression of gastric cancer

Резюме

Состояние гипоксии является одной из важных характеристик рака желудка. Установлено, что данное состояние связано не только с уменьшением ответа на лечение, но и с увеличением процента злокачественной прогрессии, то есть вероятностью раннего рецидива, местного распространения и метастазами. Последние литературные данные свидетельствуют о том, что эффект гипоксии на злокачественную прогрессию опосредуется серией вызванных гипоксией протеомических и геномных изменений, которые активируют ангиогенез, анаэробный метаболизм и другие процессы, позволяющие опухолевым клеткам выжить в агрессивном микроокружении. Основным регулятором адаптации опухолевых клеток к гипоксическому стрессу является индуцируемый гипоксией фактор 1 (HIF-1). Выбор и расширение новых и более агрессивных клонов, которые в конечном итоге становятся доминирующим типом опухолевых клеток, приводят к созданию порочного круга состояния гипоксии и злокачественной прогрессии.

Ключевые слова: рак желудка, индуцируемый гипоксией фактор (HIF-1), опухолевые клетки, злокачественная прогрессия, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), ангиогенез, прогностические факторы, микроокружение опухоли.

Abstract

The state of hypoxia is one of the important characteristics of stomach cancer. It was found that this condition is associated not only with a decrease in response to treatment, but also with an increase in the percentage of malignant progression, that is, the probability of early relapse, local spread and metastases. Recent literature data suggest that the effect of hypoxia on malignant progression is mediated by a series of hypoxia-induced proteomic and genomic changes that activate angiogenesis, anaerobic metabolism and other processes that allow tumor cells to survive in an aggressive microenvironment. The main regulator of the adaptation of tumor cells to hypoxic stress is the hypoxically inducible factor 1 (HIF-1). The selection and expansion of new and more aggressive clones, which eventually become the dominant type of tumor cells, lead to the creation of a vicious circle of the state of hypoxia and malignant progression.

Keywords: gastric cancer, hypoxic inducible factor (HIF-1), tumor cells, malignant progression, vascular endothelial growth factor (VEGF), angiogenesis, prognostic factors, microenvironment of the tumor.

По данным International Agency for Research on Cancer (IARC), рак желудка находится на 4-м месте по распространенности среди всех злокачественных опухолей в мире. В структуре онкологической смертности рак желудка занимает 2-е место [1]. Рак желудка развивается из мутированной клетки и вызывает значительную заболеваемость и смертность несколькими путями: либо путем проникновения в нормальную ткань, либо путем раннего метастазирования в жизненно важные органы, такие как печень, легкие или органы брюшной полости. Процесс прогрессирования рака желудка характеризуется быстрым клеточным ростом, сопровождающимся изменениями в микроокружении опухолевых клеток. Изменение микроокружения происходит из-за недостаточного количества кислорода и, как следствие, возникающей гипоксии [2, 3]. Для своего роста опухоли должны образовывать собственную сосудистую сеть и создавать свой круг кровоснабжения, что достигается либо путем включения существующих сосудов-хозяев, либо путем образования новых микрососудов посредством воздействия факторов ангиогенеза опухоли. Новосозданная кровеносная сеть значительно отличается от той, которая обнаруживается в нормальной ткани желудка и характеризуется широким спектром структурных и функциональных нарушений, включая растяжения, неполные или отсутствующие эндотелиальные прокладки и мембраны, протекание, нерегулярную и извилистую архитектуру, артериовенозные шунты, отсутствие стенозирующих компонентов и рецепторов [4]. Эти аномалии приводят к нерегулярному и вялому кровотоку, тем самым уменьшая доставку кислорода и питательных веществ в опухолевые клетки с последующим развитием гипоксических зон в тканях. Оксигенационный статус опухоли может ухудшаться за счет увеличения диффузионных расстояний, которые возникают, когда опухолевые клетки распространяются за пределы расстояния, которое дает адекватную доставку кислорода кровеносными сосудами (>70 мкм) [5]. На протяжении многих лет гипоксическое состояние опухоли признавалось потенциальной проблемой из-за неблагоприятного воздействия на эффективность лечения. Однако гипоксия недавно стала основным фактором, который влияет на пролиферацию опухоли желудка и злокачественную прогрессию [6]. Некоторые из эффектов гипоксии отрицательно влияют на рост опухолевых клеток [7], они могут также приводить к реакциям, которые усиливают злокачественную прогрессию и агрессивность, что в итоге приводит к повышенной устойчивости к лечению и, как следствие, плохим прогнозам. Злокачественная прогрессия, связанная с гипоксическим состоянием опухоли, опосредована несколькими механизмами, включая изменения в экспрессии генов, инактивацию генов-супрессоров или активацию онкогенов и геномную нестабильность. Этот обзор и посвящен этому вопросу.

Гипоксия – это состояние, когда напряжение кислорода менее 7 мм рт. ст. Данное состояние может вызывать изменения в протеоме опухолевых клеток, что приводит к нарушению роста или гибели клеток, апоптозу и некрозу всего клеточного цикла [8–12]. Гипоксия может индуцировать протеомические изменения, которые позволяют опухолевым клеткам успешно адаптироваться или преодолевать состояние, обедненное кислородом и лишенное питательных веществ, и выживать во враждебном микроокружении. Это достигается за счет гипоксия-стимулированного ангиогенеза, гликолиза, ингибирования апоптоза и усиления регуляции ряда факторов роста (тромбоцитарного-B [PDGF-B], фактора-бета [TGF- β], инсулиноподобного фактора – 2 [IGF-2], эпидермального фактора роста [EGF]) и других белков [6, 13]. Кроме того, гипоксия может вызывать пониженную регуляцию молекул адгезии, что облегчает отторжение опухолевой клетки [14, 15]. Многие из этих генов, индуцируемых гипоксией, контролируются индуцируемым гипоксией фактором 1 (HIF-1).

Клетки, которые плохо насыщены кислородом, демонстрируют серию адаптивных ответов, которые обеспечивают выживание и продолжение их пролиферации. Среди

Известные гены-мишени HIF-1

Adenylate kinase 3	IGF-2
$\alpha_{1\beta}$ -adrenergic receptor	IGF binding protein 1
Adrenomedullin	IGF binding protein 3
Aldolase A	Lactate dehydrogenase A
Aldolase C	Nitric oxide synthetase 2 (NOS 2)
Carbonic anhydrase IX	p21
Carbonic anhydrase XII	p35srj
Coeruloplasmin	Phosphofructokinase L
Endothelin-1 (ET-1)	Phosphoglycerate kinase 1
Enolase 1 (ENO1)	Plasminogen activator inhibitor-1
Erythropoietin (EPO)	PDGF-B
GLUT-1	Pyruvate kinase M
Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	Transferrin receptor
Heme oxygenase 1	TGF- α
Hexokinase 1	VEGF
Hexokinase 2	Flt-1

них изменения в экспрессии генов для эритропоэтина, ангиогенного сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), рецепторов трансферрина и других белков позволяют разработать более эффективный источник кислорода и питательных веществ. Другая группа генов, участвующих в этом адаптивном ответе, контролирует метаболические пути, которые могут удовлетворять требованиям к клеточной энергии (например, гликолитические ферменты и транспортеры глюкозы). Экспрессия генов большинства этих белков регулируется HIF-1 α . Этот транскрипционный фактор был впервые предложен Semenza и коллегами в качестве регулятора экспрессии эритропоэтина, вызванной гипоксией [16–18], и с тех пор неоднократно в работах было показано, что он регулирует экспрессию более 15 целевых генов (см. таблицу).

Эти гены также играют роль в прогрессировании опухолей, тем самым способствуя агрессивности опухоли и раннего метастазирования, а следовательно, в ухудшении прогноза рака желудка (рис. 1) [19]. Другими факторами, участвующими в регуляции кислородозависимой транскрипции, являются ядерный фактор каппа В (NF- κ B) и активаторный белок-1 (AP-1).

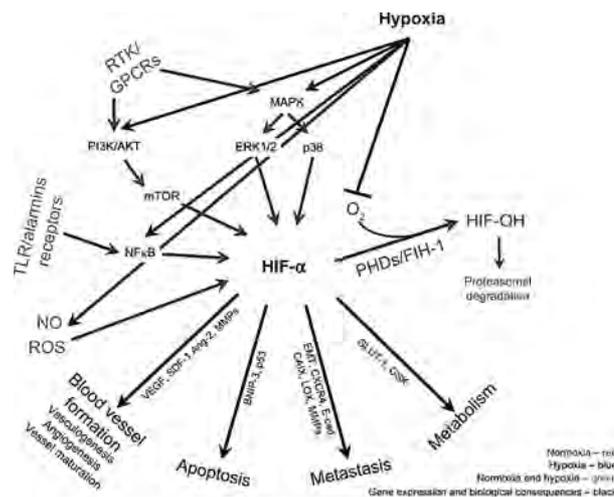


Рис. 1. Экспрессия HIF-1 в опухоли: причины и последствия

HIF-1 представляет собой гетеродимер, содержащий субъединицы HIF-1 α и HIF-1 β , обе из которых являются основными транскрипционными факторами спиральной петли [17, 20]. HIF-1 β представляет собой ядерный белок, который конститутивно экспрессируется и не зависит от напряжения кислорода в тканях [21]. HIF-1 α , в отличие от HIF-1 β , представляет собой цитоплазматический белок, чувствительный к уровням оксигенации. В хорошо оксигенированных клетках HIF-1 α непрерывно деградирует с помощью ubiquitin-proteasome system. Этот процесс разложения происходит только тогда, когда некоторые остатки пролина HIF-1 α гидроксигированы и требуют кислородозависимой активности фермента [22]. Только HIF-1 α , содержащий модифицированные сайты пролина, связывается с белком von Hippel-Lindau, который является компонентом узнавания лиганды E3 ubiquitin, которая нацелена на HIF-1 α для протеасомной деградации. В гипоксических условиях субъединицы HIF-1 α транслицируются в ядро, где они гетеродимеризуются с субъединицами HIF-1 β . Полученный продукт представляет собой активный белок HIF-1, который связывается со специфическими элементами гипоксического ответа, присутствующими в целевых генах, в конечном счете активируя транскрипцию этих генов, которые кодируют эритропоэтин, VEGF, различные гликолитические ферменты, трансферрин и ряд других белков, необходимых для системного, локального и внутриклеточного гомеостаза. Кислород определяет подчинение HIF-1 α гидроксигированию белка. В условиях, когда напряжение кислорода в клетках нормальное, убиквитинирование HIF-1 α направлено на субъединицу для деградации протеасом. В гипоксических условиях HIF-1 β димеризуется с HIF-1 α , а активный димер HIF-1 связывается с элементами реакции гипоксии, содержащими последовательность узнавания 5'-RCGTC-3', а затем рекрутирует молекулы коактиватора, что приводит к образованию комплекса инициации транскрипции и синтезу мРНК, приводя к биосинтезу белков, которые опосредуют ответные реакции на гипоксическое состояние [23] (рис. 2).

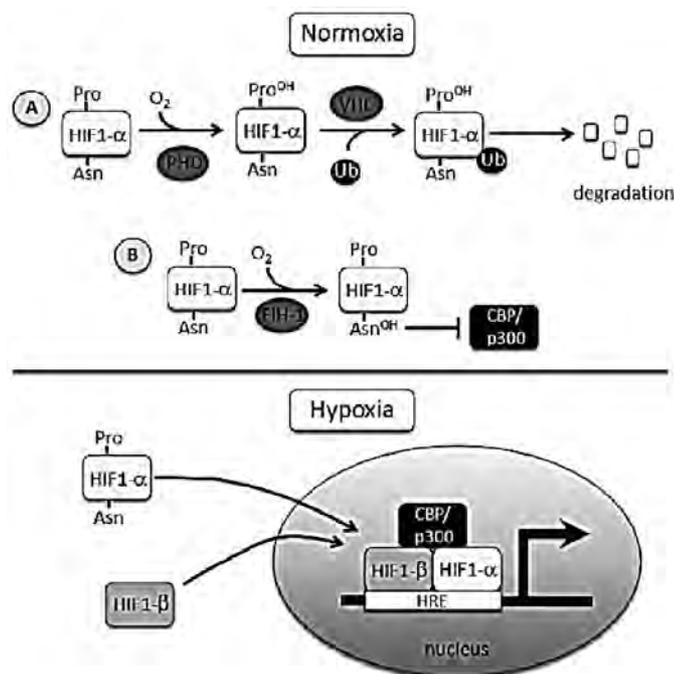


Рис. 2. HIF-1 α и уровень оксигенации

Важно отметить, что подавляющее большинство этих генных продуктов экспрессируется в опухолевых клетках рака желудка [19]. Адаптивные реакции на низкие уровни кислорода служат компенсаторным механизмом для увеличения доставки кислорода и питательных веществ для клеток с недостаточным содержанием кислорода. Однако для гипоксических опухолевых клеток эти адаптивные ответы могут дополнительно способствовать выживанию клеток, дальнейшему их развитию и метастазированию [24–26].

Ангиогенез – это процесс, посредством которого новые кровеносные сосуды развиваются из существующей сосудистой сети, обеспечивая тем самым механизм поддержания адекватного кровотока в расширяющихся клеточных популяциях опухолевой ткани. В растущей опухоли увеличивается потребность в кислороде как источнике питания и снижается его доставка, главным образом из-за недостаточного кровоснабжения и увеличения диффузионных расстояний между кровеносными сосудами и клетками, которые активно потребляют кислород. Это приводит к гипоксии в расширяющейся опухолевой массе, вызывая стимуляцию ангиогенеза для ликвидации гипоксического состояния. В опухолевой ткани способность индуцировать ангиогенез ассоциируется с развитием агрессивного фенотипа, поскольку метастатические клетки имеют больше возможностей войти в кровоток в хорошо васкуляризированной опухоли и тем самым избежать враждебного микроокружения [25, 27]. Одним из наиболее сильных стимуляторов ангиогенеза является VEGF, который необходим для пролиферации и миграции сосудистых эндотелиальных клеток, что позволяет создавать новые кровеносные сосуды [28, 29]. Получение VEGF вызывается гипоксическим состоянием путем активации транскрипции гена VEGF HIF-1 [30]. Основное значение HIF-1 в ангиогенезе было продемонстрировано в нескольких экспериментальных и клинических исследованиях [31]. Carmeliet et al. сообщили о сниженной гипоксической индукции VEGF *in vitro* в эмбриональных стволовых клетках мыши с инактивированными генами HIF-1 α [32]. Ryan и др. в исследованиях *in vivo* обнаружили, что опухоли, полученные из HIF-1 α эмбриональных стволовых клеток, имели меньше кровеносных сосудов и нарушали гемодинамику в опухолевой ткани [33]. Кроме того, показано, что VEGF стимулирует миграцию макрофагов путем активации рецептора VEGF FLT-1. Макрофаги производят несколько ангиогенных факторов, включая VEGF и фактор некроза опухолей альфа TNF- α [34, 35]. На клиническом уровне результаты большинства исследований говорят в пользу независимого прогностического воздействия экспрессии VEGF в отношении безрецидивной и общей выживаемости при раке желудка. Кроме того, экспрессия VEGF может быть предсказательной для анатомического участка первого этапа рецидивирования. В дополнение к VEGF другие продукты и рецепторы, связанные с ангиогенезом, регулируются HIF-1. К ним относят: PDGF-B, VEGFR-1, эндотелин-1, индуцибельный синтетический оксид азота (iNOS), моноцитарный хемотаксический белок, адреномедуллин и EGF. Было показано, что некоторые из них, включая iNOS, эндотелин-1, гемоксигеназу-1 и адреномедуллин, играют роль в регуляции местного кровотока путем модуляции тонуса сосудов [36]. Оказалось, что HIF-1 не только опосредует ангиогенез индукцией VEGF, но также влияет на кровоток опухоли более сложными механизмами, включающими гены-мишени, играющие роль в формировании тонуса сосудов. Еще одним механизмом стимуляции опухолевого ангиогенеза является индукция HIF-1 и VEGF после соматической мутации. Одним из примеров этого является потеря активности опухолевых супрессоров p53 либо путем прямой мутационной инактивации, либо путем экспрессии лигазы убиквитина, участвующей в деградации p53. Потеря активности p53 приводит к снижению апоптоза, опосредованного гипоксией, повышенной экспрессии HIF-1 и последующему увеличению HIF-1-опосредованной трансактивации VEGF и других генов-мишеней, что облегчает процессы ангиогенеза опухоли [37].

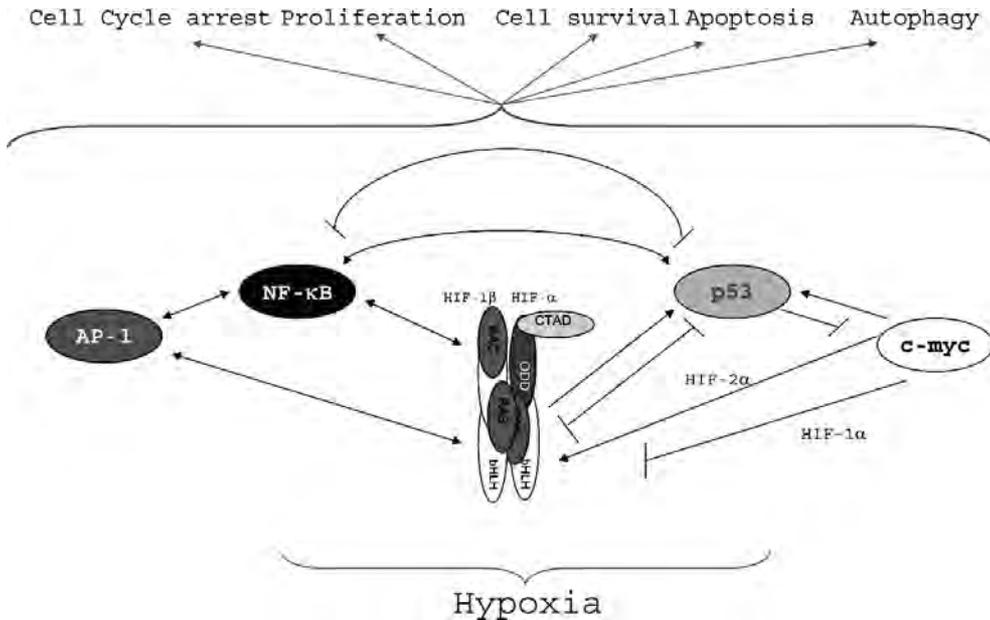


Рис. 3. Факторы транскрипции, регулируемые HIF

Хотя HIF-1 и играет ключевую роль в гипоксической реакции, существуют и другие факторы, регулируемые гипоксией. Например, inhibitor of NF-kappaB kinase (NF-κB) может также активироваться гипоксией [38]. Активация NF-κB приводит к транскрипции целевых генов, таких как кодирующие провоспалительные цитокины (например, интерлейкины 6 и 8, TNF-α) и циклооксигеназы-2 (COX-2). COX-2 обладает ангиогенными и стимулирующими рост свойствами и способен активировать гены для урокиназоподобного активатора плазминогена и матричной металлопротеиназы-2, оба из которых связаны с процессами инвазии опухоли желудка. Показано, что NF-κB играет важную роль в регуляции апоптоза, поскольку приводит к избыточной экспрессии антиапоптотического фактора bcl-2. AP-1 также был идентифицирован как индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор. Длительная активация AP-1 гипоксией может зависеть от HIF-1α, причем оба они взаимодействуют в трансактивации целевых генов. Хотя HIF находится в центре гипоксического ответа, но другие факторы транскрипции также чувствительны к гипоксии. Взаимодействие и антагонизм между этими факторами транскрипции в конечном итоге приводят к клеточному ответу. Продолжительность и интенсивность воздействия гипоксии определяет исход транскрипции. Хотя AP-1 и NF-κB в основном взаимодействуют с HIF, p53 антагонизирует его, тогда как c-Мус имеет предпочтительность HIF-α-субъединицы (рис. 3) [39].

Результаты нескольких доклинических исследований свидетельствуют, что гипоксия с реоксигенацией или без может приводить к злокачественному прогрессированию и неблагоприятному прогнозу. Частота мутаций культивируемых клеток повышается при многократном воздействии гипоксии с последующей реоксигенацией, что указывает на нарушение возможностей восстановления клеток. Высказано предположение, что повторяющиеся циклы «гипоксии – реоксигенации» могут функционировать как мутагенная сила за счет увеличения уровней супероксидов и других радикалов кислорода [40].

ВЫВОДЫ

Можно предположить на основе продемонстрированного выше воздействия гипоксии на злокачественную прогрессию и терапевтический ответ, приводящий к плохим исходам заболевания, что гипоксия опухоли желудка является растущей проблемой клинической онкологии. Результаты доклинических и клинических исследований за последние годы доказали, что опухолевая гипоксия может способствовать развитию злокачественной прогрессии с помощью нескольких механизмов, включая повышенную экспрессию транскрипционных факторов и генных продуктов, участвующих в распространении опухоли и индукции геномной нестабильности (например, точечные мутации, делеции, и амплификация генов). В этих исследованиях транскрипционный фактор HIF-1 стал основным регулятором адаптивных процессов (включая и ангиогенез), которые могут поддерживать выживаемость, пролиферацию, инвазию и метастазирование опухолевых клеток. Кроме того, показано, что гипоксия может усиливать злокачественную прогрессию и повышать агрессивность опухолевого процесса через клональный отбор. Поэтому изучение гипоксического воздействия на опухоль является важной проблемой в клинической онкологии рака желудка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brown J.M. (2000) Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today*, 6, pp. 157–162.
2. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. (1989) Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res*, 49, pp. 6449–6465.
3. Ryan H.E., Poloni M., McNulty W. (2000) Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res*, 60, pp. 4010–4015.
4. Folkman J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, 82, pp. 4–6.
5. Vaupel P, Briest S., Höckel M. (2002) Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. *Wien Med Wochenschr*, 152, pp. 334–342.
6. Höckel M., Vaupel P. (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, 93, pp. 266–276.
7. Vaupel P, Harrison L. (2004) Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The Oncologist*, 9 (suppl 5), pp. 4–9.
8. Moulder J.E., Rockwell S. (1987) Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev*, 5, pp. 313–341.
9. Durand R.E. (1991) Keynote address: the influence of microenvironmental factors on the activity of radiation and drugs. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 20, pp. 253–258.
10. Giaccia A.J. (1996) Hypoxic stress proteins: survival of the fittest. *Semin Radiat Oncol*, 6, pp. 46–58.
11. Riva C., Chauvin C., Pison C. (1998) Cellular physiology and molecular events in hypoxia-induced apoptosis. *Anticancer Res*, 18, pp. 4729–4736.
12. Haroon Z.A., Raleigh J.A., Greenberg C.S. (2000) Early wound healing exhibits cytokine surge without evidence of hypoxia. *Ann Surg*, 231, pp. 137–147.
13. Krishnamachary B., Berg-Dixon S., Kelly B. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*, 63, pp. 1138–1143.
14. Koong A.C., Denko N.C., Hudson K.M. (2000) Candidate genes for the hypoxic tumor phenotype. *Cancer Res*, 60, pp. 883–887.
15. Czekay R.P., Aertgeerts K., Curriden S.A. (2003) Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol*, 160, pp. 781–791.
16. Semenza G.L., Wang G.L. (1995) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 12, pp. 5447–5454.

17. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, pp. 5510–5514.
18. Wang G.L., Semenza G.L. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270, pp. 1230–1237.
19. Semenza G.L. (2000) Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35, pp. 71–103.
20. Giordano F.J., Johnson R.S. (2001) Angiogenesis: the role of the microenvironment in flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev*, 11, pp. 35–40.
21. Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. (2001) Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 11, pp. 293–299.
22. Semenza G.L. (2001) Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr Res*, 49, pp. 614–617.
23. Semenza G.L. (2001) HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*, 107, pp. 1–3.
24. Semenza G.L. (2001) Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance. *J Clin Invest*, 108, pp. 39–40.
25. Goonewardene T.I., Sowter H.M., Harris A.L. (2002) Hypoxia-induced pathways in breast cancer. *Microsc Res Tech.*, 59, pp. 41–48.
26. Semenza G.L. (2002) HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*, suppl 4, pp. 62–67.
27. Hanahan D., Christofori G., Naik P. (1996) Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer*, 32A, pp. 2386–2393.
28. Pepper M.S., Ferrara N., Orci L. (1991) Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 181, pp. 902–906.
29. Pepper M.S., Vassalli J.D., Orci L. (1992) Proteolytic balance and capillary morphogenesis in vitro. *EXS*, 61, pp. 137–145.
30. Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16, pp. 4604–4613.
31. Maxwell P.H., Ratcliffe P.J. (2002) Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 13, pp. 29–37.
32. Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.M. (1998) Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394, pp. 485–490.
33. Ryan H.E., Lo J., Johnson R.S. (1998) HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J*, 17, pp. 3005–3015.
34. Leibovich S.J., Polverini P.J., Shepard H.M. (1987) Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor- α . *Nature*, 329, pp. 630–632.
35. Leek R.D., Hunt N.C., Landers R.J. (2000) Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol*, 190, pp. 430–436.
36. Wenger R.H. (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J*, 16, pp. 1151–1162.
37. Ravi R., Mookerjee B., Bhujwalla Z.M. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev*, 14, pp. 34–44.
38. Koong A.C., Chen E.Y., Giaccia A.J. (1994) Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B α on tyrosine residues. *Cancer Res*, 54, pp. 1425–1430.
39. Laderoute K.R., Calaoagan J.M., Gustafson-Brown C. (2002) The response of c-jun/AP-1 to chronic hypoxia is hypoxia-inducible factor 1 α dependent. *Mol Cell Biol*, 22, pp. 2515–2523.
40. Cairns R.A., Kalliomaki T., Hill R.P. (2001) Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer Res*, 61, pp. 8903–8908.

Поступила/Received: 29.05.2017

Контакты/Contacts: antoshka20083@rambler.ru

УДК 616-006

Базаров Н.И., Касымов М.М., Аминов П.О., Рахимов Н.М., Нарзулоев В.А.
Таджикский государственный медицинский университет имени Абуали ибни Сино, Душанбе,
Таджикистан

Bazarov N., Kasymov M., Aminov P., Rakhimov N., Narzuloev V.
Tajik State Medical University named after Abuali Ibn Sino, Dushanbe, Tajikistan

Некоторые аспекты применения костных ксеногенных и других трансплантатов при реконструктивно-восстановительных этапах операций по удалению опухолей костей скелета (обзор литературы)

Some aspects of the use of xenogenic bone
and other transplants in reconstructive phases
of operations to remove bone tumors of the skeleton
(literature review)

Резюме

В обзоре литературы представлены сведения о способах консервирования, снижения чужеродности костных ксенотрансплантатов, гематологических, иммунологических показателях крови в динамике, эффективности и осложнениях применения костных ксеногенных и других трансплантатов (ККДТ) при реконструктивно-восстановительных этапах операций по удалению опухолей костей скелета. Применение ККДТ позволило ускорить хирургическую реабилитацию пациентов с опухолями и опухолеподобными процессами костей скелета.

Ключевые слова: опухоли и опухолеподобные процессы костей скелета, различные костные трансплантаты и композиционный материал быстрого твердения, результаты и осложнения их применения.

Abstract

The literature review presents data on methods of conservation, reduce the foreignness of the xenograft bone, hematological, immunological blood parameters in dynamics, efficiency and complications of the use of xenogenic bone and other transplants (KFTC) in reconstructive phases of operations to remove bone tumors of the skeleton. Use the KFTC allowed to accelerate after the surgical rehabilitation of patients with tumors and tumor-like processes of bones.

Keywords: tumors and tumor-like processes of bone, various bone grafts and composite materials rapid hardening, results, and complications of their use.

Одним из важных направлений трансплантологии является создание консервантов, обладающих биологическим, биохимическим, физиологическим и физическим составом и свойствами, наиболее близкими к естественным средам человеческого организма. Трансплантаты и их консерванты должны обладать сниженной чужеродностью, канцерогенностью и высокими антисептическими, противоопухолевыми действиями, в то же время свойствами, сохраняющими рельефную анатомию, пластический и опорный компоненты [4, 5, 14, 35]. Применение костных трансплантатов ксеногенного происхождения имеет высокую степень чужеродности. Поэтому они требуют наиболее сильных воздействий при обработке с целью предупреждения явлений тканевой несовместимости, которые могут развиваться после ксенотрансплантации. Основными методами снижения чужеродности костных ксенотрансплантатов (КК) до последнего времени были различные способы денатурации и коагуляции входящих в их состав белков путем воздействия сильными химическими реактивами или высокой температурой с целью так называемой депотеинизации «Кильской кости» (Kiel Bone), разработанной в ФРГ [26], заключающийся в последовательной обработке губчатых бычьих ксенотрансплантатов раствором перекиси водорода в высокой концентрации и парами эфира по способу R. Maatz и A. Vanermeister (патент 9616154 ФРГ, НКИ 30 Н 2/36, 1957). Однако специальными экспериментальными исследованиями многих зарубежных авторов было установлено, что этот материал часто рассасывается [34], а по клиническим наблюдениям результаты костнопластических операций с использованием «Кильской кости» оказались в целом неудовлетворительными [24], что авторы публикаций связывают с отрицательным воздействием применяемых химических реактивов на костное вещество трансплантатов и их пластические свойства. Известен завоевавший наибольшее распространение за рубежом способ получения так называемой Кильской кости.

Основой в развитии костной трансплантологии послужили научные достижения в области трансплантационного иммунитета, базирующиеся на клинических экспериментальных исследованиях основоположника учения о трансплантационном иммунитете, лауреата Нобелевской премии Питера Медавара, его современников и соотечественников, в особенности тех работах, которые относятся непосредственно к костной трансплантации в эксперименте [23, 25, 27], открывших пути снижения антигенности костных ксенотрансплантатов и их использования в клинической медицине без подбора доноров по антигенной совместимости и применения иммуносупрессивных воздействий. Согласно данным [28], при костной пластике в эксперименте в клинике (более чем у 1000 пациентов) испытан бычий костный спонгиозный ксенотрансплантат, подвергнутый воздействию высокой (1250 °С) температуры. Авторы называют его «керамизированной костью». Однако применение этого материала, по рекомендациям авторов, ограничено замещением небольших костных дефектов при использовании в качестве дополнения к аутогенным костным трансплантатам, к тому же противопоказанием является наличие инфицированного костного ложа.

В СССР применение КК начато в 1961 г. под руководством академика РАМН В.В. Кованова [12]. Для консервации был использован формальдегид в сильном разведении, что приводило к явлению обратимости блокирования обменных процессов в ткани, то есть к так называемому анабиозу. Биологическая ценность пластического материала сохраняется в период от 20 суток до 1 года [19, 30]. В.Ф. Парфентьевой с соавторами (1965) [14] было предложено консервировать костную ткань в слабом растворе формалина (0,25–0,5%). Первые сообщения в СССР по результатам пересадки КК, консервированных в растворах формальдегида тканей, были сделаны в 1965 г. на 23-й научной конференции Кишиневского медицинского института [14]. В 1969 г. вышла в свет монография

В.Ф. Парфентьевой в соавторстве «Консервация гомологичных костных трансплантатов», после чего метод нашел много сторонников как в СССР, так и за рубежом. Эти исследования послужили толчком для широкого применения 0,25–0,5% растворов формалина для консервации костей, хряща, сухожилий, связок, фасций, твердой мозговой оболочки, нервов, сосудов, клапанов сердца, трахеи, пищевода, мочевого пузыря, тонкой и толстой кишок. Использование тканей животных расширяет возможности восстановительной хирургии и открывает реальные пути для создания практически неограниченного запаса полноценного пластического материала [24, 34, 35]. По применению КК в 1984 г. в Советском Союзе были защищены 7 докторских и около 40 кандидатских диссертаций. Э.Ф. Машков, С.Г. Горев (1984) [15], давая сравнительную оценку способам краниопластики, проведенной у 170 пациентов различными материалами, в том числе и аутокостью, временно сохраненной под кожей брюшной стенки пациента, приходят к заключению о том, что применение формализированных краниотрансплантатов является весьма перспективным методом лечения пациентов с дефектами костей черепа. Установлено, что рассасывание декальцинированной пересаженной формализированной кости, особенно если это касается костей свода черепа, происходит медленно. Аутоотрансплантаты сразу после пересадки нуждаются в интенсивной оксигенации и полноценной трофике, а у аллотрансплантатов фаза анабиоза составляет 2–3 суток, когда они не нуждаются ни в кислороде, ни в питании, вместе с тем спустя 3 суток, то есть к моменту выхода ткани из состояния анабиоза, в ней благодаря ревазуляризации создаются благоприятные условия для обмена веществ. Правда, выход формализированной ткани из состояния анабиоза происходит значительно позже 2–3 суток, что способствует развитию эволюционного остеогенеза [13, 18, 30–32].

Экспериментальные и клинические исследования в области применения формализированных алло- и ксенотрансплантатов из костной ткани установили, что аллогенные костные штифты являются проводниками, по которым на фоне постоянного взаимодействия с тканями ложа реципиента происходит полноценное костное сращение. При использовании КК штифтов с той же целью этапы формирования новой ткани протекают так же, как и при аллогенной ткани, что приводит к образованию надежного костного анкилоза. Различие имелось только в сроках рассасывания-регенерации: ксеногенные штифты в отличие от аллогенных были отчетливо видны на рентгенограммах до 12 и даже 18 мес. [15, 32]. А.В. Губин (2001) [10] использовал аллогенные фетотрансплантаты в хирургии позвоночника у детей. При экспериментальном артродезе тазобедренного сустава были использованы формализированные аллогенные костные штифты. Фиксаторы создавали надежную неподвижность головке бедренной кости в вертлужной впадине, что является залогом хорошего исхода артродеза. Процесс перестройки проходил последовательно в 4 стадии: зарастание суставной щели молодой соединительной тканью, формирование фиброзной спайки и затем фиброзно-костной мозоли, образование пластинчатой кости остеогенно-балочного строения (в течение 7,5–9 мес. процесс завершается). Сформировавшийся костный регенерат связывает в единое целое головку бедренной кости с крышей вертлужной впадины на протяжении 1,5 года, при этом резорбция-регенерация длительное время выявляется только в поверхностных отделах фиксаторов и отличается незначительным врастанием скелетогенной ткани в их расширенные сосудистые каналы. Большей частью сохраняется строение старой кости – хорошо видны остециты с запусевающими ядрами. В поверхностных слоях штифтов ткань приобретает губчатое строение с напластываемой на нее молодой костной тканью, в которой видны остециты с хорошо окрашенными ядрами. Через 9–12 мес. центральные безостецитные участки штифтов полностью замещаются новообразованной костью [17].

Беллендир Э.Н., Долгова И.Б. (2003) [16] предлагают способ обработки спонгиозного костного ксенотрансплантата для костной хирургии со сниженной антигенностью до уровня, приемлемого для клинического применения, при максимальном сохранении нативных пластических свойств костной ткани. Предлагают производить обработку губчатой кости, полученной от крупного рогатого скота или других животных-доноров, которая предполагает: энзиматическую обработку в растворе протеолитического фермента террилитина в концентрации 60 ПЕ на 1 мл в течение 24 ч при температуре 37 °С; тщательное промывание подогретым до температуры 37 °С 0,9% раствором хлористого натрия до полного удаления костного мозга из межбалочных пространств; выдерживание в фосфатном буфере при pH 7,4 в течение 4 суток при температуре 37 °С; обработку тритоном X-100, растворенным в физиологическом растворе, в концентрации 0,1% в течение 24 ч при комнатной температуре с последующим промыванием 0,9% физиологическим раствором. В исследованиях [1–7] с 1981 по 2012 г. провели сравнительную оценку эффективности применения ауто- и ксенотрансплантации (различными консервантами) у 123 пациентов с костными новообразованиями и опухолеподобными процессами костей скелета (КНОПС) с изучением гематологических, иммунологических показателей крови. Применение пластики КК на основе 0,5% раствора формалина при КНОПС по сравнению с аутотрансплантацией позволяет без дополнительной операционной травмы, выраженных изменений клеточного состава периферической крови сократить время выполнения операции.

Использование восстановления КК на основе консерванта 0,5% формалина с добавлением 0,01% флавоноидов по сравнению с КК на основе 0,5% раствора формалина активизирует иммунологические показатели крови, что приводит к улучшению результатов костнопластических операций при КНОПС. Применение КК на основе 0,5% раствора формалина, флавоноидов и гентамицина по сравнению с КК на основе раствора 0,5% формалина с добавлением 0,01% флавоноидов позволяет выполнять костнопластические операции даже при КНОПС, сопровождающихся перифокальным воспалением вокруг опухолевых очагов, а также наличием очагов хронической инфекции (одонтогенный и лор-органов), получение пациентами в плане комбинированного, комплексного лечения химиолучевой терапии, а также способствует уменьшению частоты гнойно-воспалительных процессов после костнопластических операций у этих сложных пациентов.

Согласно данным [20], в МНИОИ им. П.А. Герцена с 2009 по 2012 г. для реконструкции костных структур у 17 пациентов (14 женщин, 3 мужчин; возраст 18–55 лет; медиана – 36 лет) был использован скелет натуральных кораллов семейства *Agoroga* (НК). В первой группе у 11 пациентов с доброкачественными новообразованиями костей (энхондрома – 6, остеобластокластома – 1, костно-хрящевой экзостоз – 1, костная киста – 3) НК использовался самостоятельно для реконструкции. Во второй, у 6 пациентов со злокачественными опухолями костей (хондросаркома – 3, адвантинома – 1, саркома Юинга – 2), НК использовался как дополнительный материал к аутокости. У семи пациентов опухолевый процесс локализовался в области фаланг пальцев; по два – в крыле подвздошной и большеберцовой костях; у троих в бедренной кости; двое пациентов имели поражение плечевой кости. Инфекционные осложнения были у трех пациентов. Купированы консервативно у 1, у 2 – хирургически. Через месяц после операции по данным рентгенологического исследования у всех пациентов отмечены признаки резорбции с репарацией кости. У 3 выявлен частичный выход материала в мягкие ткани с резорбцией через 3 месяца. Сроки наблюдения составили от 1 до 33 месяцев.

При рентгенологическом исследовании в сроки наблюдения 24–30 месяцев у пациентов отмечено почти полное замещение НК костной тканью. Функциональные результаты после операции для конечностей (Enneking) – улучшение

ортопедического статуса было у 88% пациентов. Продолженный рост опухоли отмечен у одной пациентки, который потребовал дополнительного вмешательства. Рецидивов не было. По результатам использования НК можно отметить высокую скорость резорбции данных материалов на фоне репарации кости. Проводили анализ результатов костно-пластических операций при гигантоклеточных опухолях трубчатых костей (ГОТК) [21] у 161 пациента (женщин было 89 (55,2%), мужчин 72 (44,7%), возраст пациентов колебался от 14 до 60 лет, в среднем 28,1 года. У 49 (30,4%) пациентов опухоль локализовалась в бедренной, у 49 (30,4%) – большеберцовой, у 2 (1,3%) – малоберцовой, у 15 (9,37%) – плечевой, у 5 (3,1%) – локтевой, у 13 (8,1%) – лучевой, у 28 (17,4%) – фалангах. Во всех случаях диагноз был верифицирован гистологическим исследованием. У 13 (8,1%) был выявлен злокачественный и у 148 (91,9%) – доброкачественный вариант течения ГОТК.

Размер поражения кости по длине составлял от 2 до 12 см. У 114 пациентов отмечено поражение от 1/3 до 1/2 полуокружности кости. Пациенты в зависимости от способа лечения были распределены на 4 группы. I группа – 76 пациентов, которым была выполнена эксскохлеация и цементопластика, II группа (35) – эксскохлеация, криовоздействие и цементопластика, III группа (15) – эксскохлеация, аутопластика и цементопластика, IV группа, контрольная (35) – эксскохлеация и аутопластика. Пациенты были прослежены от 6 месяцев до 6 лет. Как показали результаты анализа, в I группе у 7 (9,2%), во II – у 2 (5,7%), в III – у 3 (20%) и в IV – у 9 (25,7%) пациентов в сроки от 6 до 21 месяца были выявлены рецидивы ГОТК. У 4 (2,5%) пациентов отмечен патологический перелом на уровне цементопластики. Из 126 пациентов, прооперированных с применением костного медицинского цемента, у 114 (90,4%) получены хорошие функциональные результаты. Авторы публикаций отмечают, что использование криовоздействия на образующую полость после эксскохлеации и медицинского костного цемента для ее заполнения является эффективным методом хирургического лечения ГОТК, она также позволяет в 4 раза уменьшить частоту рецидива по сравнению с аутопластикой. Приводится подробный анализ клинического материала института онкологии Молдовы о тотальном эндопротезировании бедренной кости [22], которое было выполнено 5 пациентам, из них у 2 пациентов с остеогенной саркомой (ОС) дистальной трети, 1 – с ОС верхней трети, 1 – с ОС диафиза, 1 – с хондробластомой головки бедра. У пациентов с поражением дистального и проксимального конца решение выполнения тотального эндопротезирования бедренной кости было принято после сцинтиграфии скелета, где накопление препарата превышало более двух третей длины кости. У пациента с ОС, расположенной в диафизе бедра, первоначально была выполнена сегментарная резекция бедренной кости с замещением дефекта трубчатым аллотрансплантатом, который зафиксировали внутрикостным металлическим штифтом. Через 2 года штифт сместился проксимально, упираясь в крыло подвздошной кости, из-за чего был удален. Через 3,5 года у пациентки наступил перелом бедра на месте нижнего стыка трансплантата с оставшимся дистальным концом собственной кости. Впоследствии образование костной мозоли не наступило несмотря на длительное лечение, и женщина подверглась тотальному эндопротезированию бедренной кости с обоими суставами. Пациентка жива в течение 11 лет. Опорная и двигательная функция сохранена в хорошей мере. У пациентки с хондробластомой головки бедренной кости первоначально выполнена резекция верхней трети с эндопротезированием тазобедренного сустава. Через 4 года дважды наступил перелом шейки эндопротеза и вертлужного компонента. Была произведена замена эндопротеза с цементированием ножки, но впоследствии наступил некроз костной ткани на стыке с цементом, нагноение мягких тканей в области протеза. Эндопротез удален, вследствие резорбции большого участка оставшейся кости пришлось удалить всю бедренную кость с тотальным эндопротезированием через год после удаления тазобедренного эндопротеза. Функция оперированной конечности полностью

сохранена. Автор пришел к выводу, что тотальное эндопротезирование бедренной кости является операцией выбора при злокачественных опухолях, которые захватывают в процесс более двух третей длины кости. Эндопротезы, применяемые в данных случаях, должны выполняться индивидуально или с модульной конструкцией, позволяющей менять длину соответственно размерам удаленной кости. Тотальное эндопротезирование бедра является более абластичной операцией, позволяющей сохранить опорную и двигательную функцию конечности, при которой можно избежать калечащих операций.

Подводя итог обзору медицинской литературы, посвященной использованию различных костных трансплантатов и композиционных материалов быстрого твердения в клинической онкологии, следует отметить, что при локализации опухоли в трубчатых костях выполняется сегментарная резекция кости с замещением дефекта ауто- или аллотрансплантатом, эндопротезирование, а применение ксенотрансплантатов, скелета натуральных кораллов семейства *Agarora*, других трансплантатов находится в стадии клинического применения, поэтому эти разделы костной трансплантологии нуждаются в дальнейшем изучении как перспективное направление в остеотрансплантологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bazarov N. (2004) Primenenie ksenotransplantatov pri lechenii novoobrazovaniy litsevoogo skeleta i cherepa [The use of xenografts in the treatment of tumors of the facial skeleton and skull]. *Mat. III s'ezda onkologov i radiologov SNG* [Mat. III Congress of oncologists and radiologists of the CIS]. Minsk, 2, p. 6.
2. Bazarov N., Kurbanov D., Narzuloev V. (2009) Ispol'zovanie ksenogenenogo kostnogo matriksa, konservirovannogo v smesi 0,5% FA s dobavleniem gentamitsina [The use of xenogenic bone matrix, conserved in a mixture of 0.5% FA with the addition of gentamicin]. *Mat. 57 godichnoi nauchno-prakt. konf. s mezhdunarodnim uchastiem posvyaschaetsya 70-letiyu obrazovaniya Tadzhijskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta im Abuali ibni Sino* [Mat. 57 annual scientific-practical. Conf. with international participation dedicated to the 70th anniversary of the formation of the Tajik state medical University named after Abuali Ibn Sino]. Dushanbe, pp. 538–540.
3. Bazarov N. (2009) Problemi i puti realizatsii hirurgicheskogo lecheniya opuholei kraniofatsial'noi lokalizatsii detskogo vozrasta [Problems and ways of implementation of the surgical treatment of tumors of the craniofacial – localization of childhood]. *Zdravoohranenie Tadzhikestana*, 3, pp. 181–182.
4. Bazarov N. (2010) Obosnovanie k primeneniyu ksenotransplantatsii v lechenii bol'nih s novoobrazovaniyami i opuholepodobnimi protsessami kostei [The rationale for application of xenotransplantation in the treatment of patients with tumors and tumor-like processes of bone]. *Vestnik Avitsenni. Dushanbe*, 3, pp. 43–49.
5. Bazarov N. (2011) Vliyanie auto- i ksenotransplantatov na kletochnii sostav perifericheskoi krovi u bol'nih s kostnimi novoobrazovaniyami i opuholepodobnimi protsessami skeleta (KNOPS). *Onkohirurgiya. Materiali HI Vserossiiskoi konf. molod. uchenih* [The impact of auto- and xenografts on kletochnye perifericheskoi the composition of blood in patients with neoplasms and kostimi opujolevidnami protsessami skeleton (CNOPS). *Oncosurgery. Materials HEE Vserossiiskoi Conf. young. researchers*]. *Aktual'nie voprosi eksperimental'noi i klinicheskoi onkologii. Tematicheskii vipusk RSHO RSSO*, vol. 3, no 4, p. 11.
6. Bazarov N. (2011) Otsenka effektivnosti reabilitatsii bol'nih s kostnimi novoobrazovaniyami i opuholepodobnimi protsessami skeleta (KNOPS). *Onkohirurgiya Materiali HI Vserossiiskoi konf. molod. uchenih* [Evaluation of the effectiveness of rehabilitation of patients with bone tumors and tumor-like processes of the skeleton (CNOPS). *Surgery Materials HEE all-Russian Conf. young. scientists*]. *Aktual'nie voprosi eksperimental'noi i klinicheskoi onkologii Tematicheskii vipusk PCXO RSSO*, vol. 3, no 4, pp. 11–12.
7. Bazarov N. (2011) Vliyanie primeneniya antibiotika gentamitsin na immunologicheskie pokazateli krovi u bol'nih s opuholyami i opuholepodobnimi protsessami skeleta (KNOPS),

- pri ksenotransplantatsii [The effect of antibiotic gentamicin on the immunological parameters of blood in patients with tumors and tumor-like processes of the skeleton (KNOPS), in xenotransplantation]. *Godichnaya nauchno-prakticheskaya konf. Tadjhgosmeduniversiteta «Rol' meditsinskoj nauki v ozdorovlenii obschestva», posvyaschennaya 20-letiyu nezavisimosti Respubliki Tadjikistan* [Scientific-practical Conf. Tachospeedometer “the Role of medical science in the improvement of society”, dedicated to the 20th anniversary of independence of the Republic of Tajikistan]. Dushanbe, pp. 295–296.
8. Boltrukevich S. (1985) *Transplantatsiya konservirovannoi rastvorami al'degidov allogennoi kostnoi tkani* [Transplantation of canned solutions of aldehydes allogeneic bone] (PhD Thesis), M. – Grodno, 46 p.
 9. Boltrukevich S. (2007) *Primenenie allogennih kostnih transplantatov v klinicheskoi praktike* [The use of allogenic bone grafts in clinical practice]. *Aktual. voprosi eksper. hirurgii, transplantol. i konservirovaniya transplantatov* [Aktual. questions the expert. surgery, the transplant. and canning transplants]. Dushanbe, pp. 132–134.
 10. Gubin A. (2001) *Kostnaya plastika allogennimi fetotransplantatami v hirurgii pozvonochnika u detei (eksperimental'no-klinicheskoe issledovanie)* [Bone grafting allogeneic FotoTranslate in spine surgery in children (experimental clinical research)] (PhD Thesis), SPb, 21 p.
 11. Kirillova I. (2003) *Vliyaniye fizicheskikh i himicheskikh faktorov na induktivnii osteosintez pri peresadke demineralizovannogo kostnogo transplantata (eksperimental'noe issledovanie)* [The influence of physical and chemical factors on inductive osteogenesis transplantation of demineralized bone graft (experimental study)] (PhD Thesis), M., 24 p.
 12. Kovanov V. (1994) *K mehanizmu deistviya formal'degida i flavonoidov v protsesse vosstanovleniya tselostnosti organizma posle operatsii alloplastiki tolstoy kishki i zheludka konservirovannim kolotransplantatom* [К механизму действия формальдегида и флавоноидов в протсессе восстановления тselостности организма после оператсии аллопластики толстой кишки и желудка консервированным колотрансплантатом]. *Vopr. pitan. regul. gomeostaza*, vol. 2, pp. 191–206.
 13. Kozub K. (1986) *CHreskostnii osteosintez apparatom Ilizarova v sochetanii s vnutrikostnoi fiksatsiei otlomkov formalinizirovannimi alloshtiftami* [Transosseous osteosynthesis by Elizarov's apparatus in combination with intraosseous fixation of fragments formalisierung Hello pins]. *Formalinizir. allo- i ksenomaterial v transplantologii*. Kishinev, pp. 86–87.
 14. Parfent'eva V., Rozvadovskii V., Dmitrienko V. (1969) *Konservirovaniye gomologichnih kostnih transplantatov* [Preserving homologous bone grafts]. Kishinev: SHTinitisa, 115 p.
 15. Mashkov E., Gorev S. (1984) *Sravnitel'naya otsenka sposobov kranioplastiki* [Comparative evaluation of methods cranioplastic]. *Mat. IV Vses. s'ezda travmatologov-ortopedov* [Mat. IV All-Union Conf. Congress of traumatologists and orthopedists]. Kuibishev, p. 99.
 16. Melenberg T., Volova L. *Pat. 2301684 S1 Rossiiskoi Federatsii, MPK7 A61L27/54 Transplantatsionnaya smes'. № 2005136145/15; opubl. 27.06.2007, Byul. 6. 21 p.*
 17. Stomatin S., Grumeza M., Many A. (1986) *Primenenie formalinizirovannih allokostnih transplantatov v komplekse lecheniya perelomov vivihov krupnih segmentov konechnosti* [The use of formalinized allocentric transplants in complex treatment of fractures dislocation of large segments of the limbs]. *Formalinizir. allo- i ksenomaterial v transplantologii*. Kishinev, pp. 74–75.
 18. Tel'puhov V. (1989) *Protivoishemicheskaya zaschita golovnogogo mozga, miokarda i konservirovaniye kostnoi tkani v hirurgii rastvorami formal'degida (eksperimental'noe issledovanie)* [Anti-ischemic protection of the brain, myocardium and preserving the bone tissue in surgery aqueous formaldehyde (experimental study)] (PhD Thesis), M., 40 p.
 19. Tel'puhov V., Nikolaev A. (2007) *Profilaktika ishemicheskikh povrezhdenii golovnogogo mozga v eksperimente* [Prevention of ischaemic brain damage in experiment]. *Aktual. voprosi eksper. hirurgii, transplantol. i konservirovaniya transplantatov* [Aktual. questions expert. surgery, transplanta. and canning transplants]. Dushanbe, pp. 288–291.
 20. Teplyakov V., Sergeeva N., Mislvtsev I., Sviridova I., Buharov A., Frank G., Kirsanova V., Ahmedova S., Karpenko V., Ahmerova E. *Rekonstruktsiya kostnoi tkani s ispol'zovaniem skeleta natural'nih korallor aropora cervicornis u bol'nih s novoobrazovaniyami kostei* [Reconstruction of bone using the skeleton of natural corals of Acropora cervicornis in patients with bone tumors]. *Proceedings of the VII s'ezd onkologov i radiologov stran SNG, Astana, Respublika Kazhstan 5–7 sentyabrya 2012 g.*, p. 541.

21. Tozhiboev A., Gafur-Ahunov M., Abdikarimov H. Kostnoplasticheskie operatsii v lechenii gigantokletochnoi opuholi trubchatih kostei [Osteoplastic operations in the treatment of giant cell tumors of long bones]. Proceedings of the VII s'ezd onkologov i radiologov stran SNG, Astana, Respublika Kazahstan 5–7 sentyabrya 2012 g., p. 545.
22. CHuperka V. Opit total'nogo endoprotezirovaniya bedra pri opuholyah bedrennoi kosti [Experience of total hip arthroplasty for tumors of the femur]. Proceedings of the VII s'ezd onkologov i radiologov stran SNG Astana Respublika Kazahstan 5–7 sentyabrya 2012, p. 549.
23. Burwell R.G., Gowland G. (1962) Studies in transplantation of bone III. The immune responses of lymph nodes draining components of fresh homologous cancellous bone and homologous bone treated by different methods. *J. Bone Joint Surg.*, vol. 44, no 1, pp. 131–138.
24. Chakour K. (1974) Klinische Untersuchungen ber die Zeitungsfhigkeit der Kieler Knochen Spanes. *Ztschr. Orthop.*, vol. 112, no 1, pp. 207–217.
25. Glassman S.D., Carreon L.Y., Campbell M.J. (2008) The perioperative cost of Infuse bone graft in posterolateral lumbar spine fusion. *Spine J.*, vol. 8, no 3, pp. 443–448. doi: 10.1016/j.spinee.2007.03.004. PMID 17526436.
26. Maatz R., Bauermeister A. *Verfahrung zur Prparierung von zur Verpflanzung geeigneten Knochen. Deutsches Patentamt. Patentschrift 961654.*
27. Marx R.E. (1994) Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clin Plast Surg.*, vol. 21, p. 377.
28. Mittelmeier H., Mittelmeier W., Gleitz. M. Mineralisches, spongises Knochenersatzmaterial Pyrost. Experimentelle Grundlagen und 13 Jahre klinische Erfahrung bei 1000 Fllen. *Orthopde*, vol. 27, no 2, pp. 121–136.
29. Neukam F.M., Schmelzeisen R. (1996) Long term results of free vascularised bone grafts in maxillofacial surgery. *J Craniomaxillofacial Surgery*, vol. 23, no 1, p. 81.
30. Sculean A., Kasaj A. (2005) Heilung von intraossären Defekten nach Behandlung mit Bio-Oss COLLAGEN und Bio-Gide Perio. Jahrestagung der AFG. *Mainz*, vol. 37, no 13.
31. Silveberg B., Banis J.C., Acland R.D. (1985) Mandibular reconstruction with microvascular bone transfer. *Am J Surg.*, vol. 150, pp. 440–446.
32. Starzl T.E. (1997) Transplantation. *JAMA*, vol. 263, no 19, pp. 2686–2689.
33. Tiwary R.M. (1993) Reconstruction of the mandible with simple bone graft. An evaluation. *Eur Arch Otolaryngol.*
34. Uehlinger E. (1967) Die allogeneinen Grundlagen der Transplantation. *Beitr. Orttop. Traumat.*, 11, pp. 610–623.
35. Zenn M.R. (1997) Current role of the radial forearm free flap in mandibular reconstruction. *Plast Reconstr Surg.*, vol. 99, no 4, pp. 1012–1017.

Поступила/Received: 08.08.2017

Контакты/Contacts: negmatbazarov@mail.ru

Чернякова Л.К.¹, Слободская Н.С.²

¹ 3-я городская клиническая больница, Гродно, Беларусь

² Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Charniakova L.¹, Slobodskaya N.²

¹ Grodno City Clinical Hospital № 3, Grodno, Belarus

² Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Опыт применения препарата Алмиба в паллиативной терапии у онкологических пациентов отделения хоспис

Experience of Almiba administration in palliathic therapy
of cancer patients in the hospice department

Резюме

В работе указаны благоприятные эффекты левокарнитина, которые учитывались при его включении в паллиативную терапию онкологических пациентов отделения хоспис, и достигнутые результаты при лечении дезинтоксикационного синдрома у этих пациентов препаратом Алмиба.

Ключевые слова: Алмиба, онкологический пациент, дезинтоксикационная терапия.

Abstract

The article shows the beneficial effects of levocarnitine, which were taken into account when it was included in the palliative therapy of cancer patients in the hospice department, and the received results in the treatment of the detoxification syndrome with Almiba in these patients.

Keywords: Almiba, oncological patient, detoxification therapy.

Алмиба (левокарнитин) является препаратом, улучшающим метаболизм и энергообеспечение тканей. Это натуральный компонент животных тканей, представляющий витаминоподобное вещество [1, 2]. В организме человека потребности физиологического обмена восполняются за счет использования продуктов, содержащих карнитин, и эндогенного синтеза в печени и почках из лизина и лецитина. Левокарнитин является биологически активным и играет основную роль в липидном обмене. Является необходимым фактором в транспорте длинноцепочечных жирных кислот в митохондрии, где происходит их окисление с образованием энергии в форме АТФ [3]. Улучшает метаболическое течение цикла Кребса, стимулирует активность пируватдегидрогеназы в скелетных мышцах. Обладает анаболическим, антигипоксическим эффектом, улучшает аппетит и активизирует жировой обмен. Энергетическое действие левокарнитина благоприятно сказывается на состоянии печени, улучшая ее дезинтоксикационную и белково-синтетическую функцию [4]. Способствует повышению ферментативной активности

желудочного и кишечного сока и стимулирует секреторную деятельность желез пищеварительного тракта. Уменьшает степень лактоацидоза. Проведенные исследования показали положительное влияние левокарнитина на состояние здоровья, увеличение массы тела и улучшение когнитивных способностей у долгожителей [5].

Фармакологическое действие левокарнитина и показания к применению включают: дефицит массы тела, физическое истощение, потерю мышечной массы, слабость скелетных мышц, анемию, кардиомиопатию, а также его применение в комплексном лечении при заболеваниях печени [6]. Противопоказанием к применению левокарнитина является только индивидуальная непереносимость. Побочные действия практически не отмечаются.

Учитывая вышеизложенное, препарат Алмиба был включен в паллиативное лечение онкологических пациентов отделения хоспис, которое направлено на максимальное облегчение симптомов, что означает достижение улучшения качества жизни [7–9].

У онкологических пациентов одним из ведущих наряду с болевым является интоксикационный синдром. Одной из причин интоксикации является циркуляция продуктов метаболизма клеток опухоли или опухолевого распада. Интоксикационная симптоматика зависит от расположения опухоли, стадии опухолевого процесса, наличия метастазов, а также проведения паллиативной химиотерапии (ПХТ) [10].

В нашем исследовании принимали участие 42 онкологических пациента с опухолями печени, наличием метастазов в печени, а также пациенты после ПТХ. При показаниях у всех поступивших в отделение хоспис корректировался болевой синдром. Кроме того, у пациентов в различной степени выраженности присутствовали жалобы, соответствующие симптомам интоксикации: на общую слабость, повышенную утомляемость, повышение температуры тела, снижение аппетита, тошноту, рвоту, неустойчивый стул, снижение веса, учащенное сердцебиение, лабильность артериального давления, тяжесть и боль в правом подреберье.

У некоторых при осмотре наблюдалась бледность кожных покровов, значительное снижение массы тела. В лабораторных показателях отмечалось повышение лейкоцитов, СОЭ, снижение общего белка, эритроцитов, гемоглобина, повышение креатинина и мочевины, а также повышение ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ).

На фоне стандартной дезинтоксикационной терапии все пациенты получали 5 мл (1 г) Алмибы внутривенно капельно на 100 мл физиологического раствора (0,9% раствора NaCl), от 7 до 10 капельниц в зависимости от степени интоксикации. При этом не встречалось признаков побочных эффектов и непереносимости препарата. В процессе лечения у всех пациентов отмечалось улучшение общего состояния: уменьшилась тяжесть и боль в правом подреберье, слабость и утомляемость, рвота и тошнота, улучшился аппетит. Результаты лабораторных исследований при поступлении и перед выпиской представлены в таблице.

Анализ показателей лабораторных исследований после курса лечения препаратом Алмиба показал достоверные различия между исходными данными и результатами при выписке у большинства пациентов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии препарата Алмиба на общее самочувствие и значительное улучшение лабораторных показателей у онкологических пациентов отделения хоспис при включении его в комплексное лечение интоксикационного синдрома.

Средние показатели лабораторных исследований

Показатели	При поступлении на лечение	При выписке	p
Лейкоциты ($\times 10^9$ г/л)	4,2 [2,2; 13,1]	7,7 [3,1; 14,5]*	p<0,02
СОЭ (мм/час)	38 [12; 67]	18 [7; 36]*	p<0,0001
Нв (г/л)	117 [75; 131]	128 [110; 146]*	p<0,0002
Общий белок (г/л)	68 [8; 80]	74 [65; 85]*	p<0,0003
Мочевина (ммоль/л)	6,7 [3,9; 18,3]	4,4 [2,2; 9,4]*	p<0,0003
Креатинин (мкмоль/л)	97 [65; 162]	75,5 [54; 118,1]*	p<0,003
Билирубин (ммоль/л)	12 [8; 37]	13 [11,5; 22]	p>0,05
Холестерин (ммоль/л)	5,6 [3,4; 10]	4,8 [4,2; 11]	p>0,05
АЛТ (МЕ)	66 [26; 175]	23 [12; 66]*	p<0,0002
АСТ (МЕ)	54 [24; 230]	23 [11; 62]*	p<0,0002
Щелочная фосфатаза (МЕ)	156 [33,1; 286]	75,2 [33; 101]*	p<0,03

Примечание:

* p – уровень значимости <0,05.

ЛИТЕРАТУРА

1. Löstner H. (2003) *Carnitin and cardiovascular diseases*. Bochum: Ponte Press Verlags-GmbH.
2. Kopelevich V.M. (2005) Vitaminopodobnie soedineniya L-karnitin i atsetil L-karnitin: ot biohimicheskikh issledovaniy k meditsinskomu primeneniyu [Vitamin-like compounds L-carnitine and acetyl L-carnitine: from biochemical studies to medicine]. *Ukrainskii biohimicheskii zhurnal*, vol. 77(4), pp. 25–45.
3. Brenner R.R. (1983) Essential fatty acids: its transformations and functions. *Arch. Latinoam. Nutr.*, vol. 33, pp. 735–747.
4. Kopelevich V.M. (2003) *Chudo Karnitina* [Miracle Carnitine]. M.: Genezis.
5. Malaguamera M., Cammalleri L., Gargante M. (2007) L-carnitine treatment reduces severity of physical and mental fatigue and increases cognitive functions in centenarians: a randomized and controlled clinical trial. *American Journal of clinical Nutrition*, vol. 86, no 6, pp. 1738–1744.
6. Ivanova M.D. (2014) Rol' levokarnitina v sistemnoi terapii patsientov razlichnogo profilya i patsientov na hronicheskom gemodialize [The role of levocarnitine in the systemic therapy of patients of different profile of patients on chronic hemodialysis]. *Pochki*, vol. 1(07).
7. Vvedenskaya E.S. (2012) Palliativnaya pomoshch' – innovatsionnoe napravlenie otechestvennogo zdorovoohraneniya [Palliative care is an innovative direction of national health care]. *Meditsinskii al'manah*, vol. 4, pp. 18–21.
8. Slobodskaya N.S. (2013) Iz istorii razvitiya hospisnogo dvizheniya: rabota Grodnenskogo otdeleniya "Hospis" [The history of the development of the hospice movement: the work of the Hrodna branch of "Hospice"]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, vol. 1, pp. 88–90.
9. *Lissabonskaya deklaratsiya* [The Lisbon Declaration]. Available at: [http:// www.pallcare.ru](http://www.pallcare.ru) (accessed 30.06.2017).
10. (2003) *Rekomendatsii Komiteta Ministrov Soveta Evropi gosudarstvam – uchastnikam po organizatsii palliativnoi pomoschi* [The recommendations of the Committee of Ministers of the Council of Europe States parties on the organization of palliative care].

Поступила/Received: 21.08.2017

Контакты/Contacts: liudmilla57@gmail.com; nellys55@bk.ru

УДК 616.61-006.31/311-021.3-039.42

Молошок А.А.¹, Ерко И.П.², Рудич Ю.В.¹, Шеремок Л.В.¹

¹ Областное патологоанатомическое бюро, Чернигов, Украина

² Областной онкологический диспансер, Чернигов, Украина

Moloshok A.¹, Jerko I.², Rudich Y.¹, Sheremok L.¹

¹ Regional pathoanatomical Bureau, Chernihiv, Ukraine

² Regional Cancer Clinic, Chernihiv, Ukraine

Редкий случай первичной злокачественной фиброзной гистиоцитомы почки

Rare case of the primary malignant fibrous histiocytoma of the kidney

Резюме

Представлен редкий случай злокачественной фиброзной гистиоцитомы (ЗФГ) почки у женщины 64 лет. Первичная ЗФГ – очень редкая опухоль почки с плохим прогнозом. Клинически диагностируется как рак почки. Диагноз ЗФГ почки может быть установлен только при гистологическом и иммуногистохимическом исследованиях.

Ключевые слова: почка, ЗФГ, иммуногистохимия.

Abstract

A rare case of a malignant fibrous histiocytoma (MFH) in a woman is 64 years old. Primary MFH is a very rare kidney tumor with poor prognosis. It is clinically diagnosed as a kidney cancer. The diagnosis of general MFH can be established with histological and immunohistochemical research only.

Keywords: kidney, MFH, immunohistochemical.

Саркомы почки относятся к мезенхимальным опухолям и составляют 1–3% от всех злокачественных почечных опухолей [1]. Более половины сарком почки – лейомиосаркомы. Злокачественная фиброзная гистиоцитома (ЗФГ) – редкий необычный тип ренальных сарком, возникающих из примитивных мезенхимальных клеток. Первое описание ЗФГ полиморфного типа было опубликовано в 1964 г. O'Brien и Stout [2]. Клиническая картина ЗФГ неспецифична. В брюшной полости пальпируется опухоль, отмечается лихорадка, утомляемость, потеря веса, желудочно-кишечные расстройства. Эти симптомы появляются поздно. При КТ и УЗИ органов брюшной полости выявляется опухоль почки, которая клинически диагностируется, как правило, как рак почки. Диагноз ЗФГ основывается на сочетании данных светооптического и иммуногистохимического исследований. ЗФГ содержит два равномерно представленных клеточных типа – фибробласто- и

гистиоцитоподобный. ЗФГ почки может исходить из капсулы или паренхимы почки. В опухоли нередко некрозы, участки обызвествления. Как и другие саркомы ЗФГ экспрессирует виментин, а также гистиоцитарные маркеры: лизоцим, фактор XIII-a, a-I-антитрипсин. Специфический маркер для ЗФГ – CD-68. Эпителиальные маркеры, как правило, негативны [3]. Лечение ЗФГ почки – это радикальная нефрэктомия. Адьювантная терапия малоэффективна. Метастазирует ЗФГ в лимфоузлы и легкие. При метастазах и рецидивах ЗФГ применяют полихимиотерапию (доксорубицин, адрибластин и др.). Эффективность лечения низкая. При наличии метастазов прогноз плохой [4].

Клинический случай

Женщина, 64 года, обратилась к онкохирургу 28 апреля 2016 г. с жалобами на боли в поясничной области справа, наличие опухоли в брюшной полости, слабость. Считала себя больной 2 месяца, с момента появления болей. При осмотре живот неправильной формы, ассиметричный. В правой половине брюшной полости пальпируется опухолевидное образование до 20 см в диаметре. Симптом Пастернацкого негативный. При УЗИ органов брюшной полости правая почка увеличена в размерах, определяется солидное образование 17×13,5 см, с зоной обызвествления 6×4 см. Левая почка без особенностей. Сосудистые ножки обеих почек дифференцированы. Забрюшинные лимфоузлы не увеличены. КТ – картина объемного образования правой почки. В анализе крови – ускоренное СОЭ (50 мм/час). Биохимические анализы без особенностей. Выполнена операция 05.05.2016 – радикальная правосторонняя нефрэктомия. На операции правая почка увеличена, деформирована опухолью, малоподвижна. Медиально опухоль доходит до нижней горизонтальной части двенадцатиперстной кишки, кзади – до мышц поясницы, перекрывает нижнюю полую вену и аорту. Вес удаленной почки с опухолью 2900 г. Послеоперационное течение гладкое. Выписана на 14-е сутки. При патологогистологическом исследовании: правая почка размером 22×17×12 см с околопочечной клетчаткой и отрезком мочеточника длиной 9 см (рис. 1). Заднелатеральный участок почки размером 12×5×2 см, с гладкой поверхностью, на разрезах корковый и мозговой слои четко дифференцируются. Переднемедиальный участок почки представлен плотным, бугристым узлом диаметром 20 см, без капсулы, на разрезах ткань узла белого цвета, с желтыми участками и участком обызвествления 6,5×4 см. Опухоль распространяется на стенку лоханки и мочеточника в верхней 1/3 его и околопочечную клетчатку. Чашечно-лоханочная система расширена. В околопочечной клетчатке лимфоузлы не выявлены. Микроскопически: опухоль представлена веретенообразными, фибробластоподобными и полигональными гистиоцитоподобными клетками, окруженными коллагеновыми волокнами с немногочисленными гигантскими полинуклеарами с причудливыми ядрами, митозами (рис. 2). Веретеновидные клетки формируют завихрения, наблюдаются участки воспаления, некроза, инвазия лимфатических сосудов, всей стенки лоханки и мышечного слоя мочеточника, распространение опухоли на паранефральную клетчатку (рис. 3). Иммуногистохимически – опухоль позитивна по CD-68 (рис. 4) и виментину, панцитокератины негативны. Установлен диагноз полиморфной ЗФГ почки. При осмотре пациента через 10 месяцев (рентген ОГК, УЗИ ОБП) метастазов и рецидива не выявлено.

Таким образом, в приведенном нами наблюдении первичная ЗФГ почки диагностировалась как рак почки, имела неспецифическую клиническую картину. Диагностирована поздно. Диагноз полиморфной ЗФГ установлен гистологически с применением иммуногистохимических исследований.

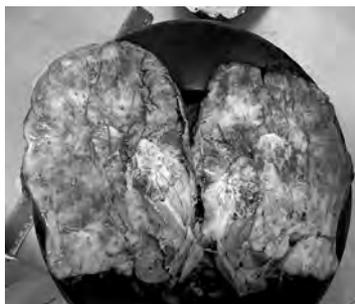


Рис. 1. Удаленная почка с опухолью

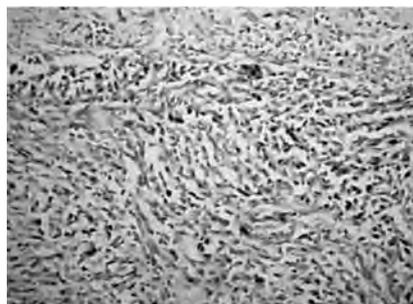


Рис. 2. Микроскопическая картина ЗФГ почки. Окраска гематоксилин-эозином, ×200

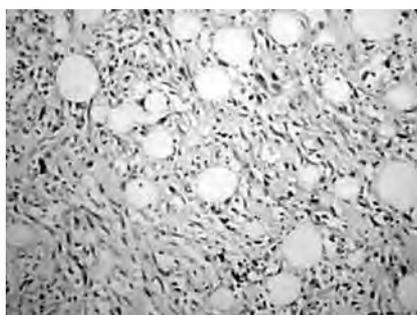


Рис. 3. Распространение ЗФГ почки на паранефральную клетчатку. Окраска гематоксилин-эозином, ×200

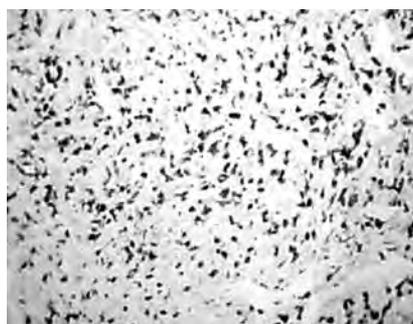


Рис. 4. Экспрессия CD-68-опухолевыми клетками, ×200

ЛИТЕРАТУРА

1. Pal'tsev M.A., Kakturskii L.V., Zairat'yants O.V. (2011) *Patologicheskaya anatomiya* [Pathological anatomy]. Natsional'noe rukovodstvo. M.: GEOTAR-MEDIA.
2. O'Brien, Stout A.P. (1964) Malignant fibrous xanthomas. *Cancer*, vol. 17, pp. 1445–56.
3. Petrov S.V., Raihlin N.T. (2012) *Rukovodstvo po immunogistohimicheskoi diagnostike opuholei cheloveka* [Manual on immunohistochemical diagnostics of human tumors]. Kazan'.
4. Cogatay Jogus, Mehmet Liker Jorce, Evren Suer, Ozden Tulunay, Mut Safak. Primary malignant fibrous histiocytoma of the kidney: report of a case and literature review. *Turkish journal of Urology*, vol. 39(3), pp. 194–7. doi:10.5152/tud 2013.039

Поступила/Received: 26.04.2017
Контакты/Contacts: svetlana@ok.net.ua

УДК 616.33-006-6:575.1-07

Джурраев М.Д., Юсупбеков А.А., Абдужаппаров С.Б., Турдикулова Ш.У., Долимова Д., Кодиров Х.Х., Абдурахмонов Б.Б.

Республиканский онкологический научный центр, Ташкент, Узбекистан
 Центр высоких технологий Академии Наук, Ташкент, Узбекистан

Djuraev M., Yusupbekov A., Abdujapparov S., Turdikulova Sh., Dolimova D., Qodirov H., Abdurahmonov B.

National Cancer Research Centre, Tashkent, Uzbekistan
 High Technologies Centre of Academy of Sciences, Tashkent, Uzbekistan

Молекулярно-генетические методы ранней диагностики рака желудка у пациентов с хроническим атрофическим гастритом

Molecular-genetic ways of early detection of gastric cancer in patients with chronic atrophic gastritis

Резюме

Хронический атрофический гастрит является наиболее важным независимым фактором риска аденокарциномы желудка, т. е. предраковым состоянием, особенно при развитии кишечной метаплазии. С целью раннего выявления рака желудка авторы провели молекулярно-генетические исследования у 60 пациентов с хроническим атрофическим гастритом. Предметом исследования являлись фрагменты слизистой желудка, взятые из 3 точек, и образцы крови. ПЦР исследование по определению участков метилирования ДНК проводилось в APC, E-кадгерин, hMLH1 и TINP3 генах. Тотальное гипометилирование выявлено у 10 (16,6%) пациентов, у остальных 50 пациентов участки метилирования ДНК не выявлены. При сопоставлении с образцами крови частота соответствия составила у 7 (70%) пациентов. При выявлении метилирования подряд в 3 и 4 генах у 2 пациентов выявлен рак желудка T₁N₀M₀.

При выявлении участков гипометилирования ДНК показан эндоскопический мониторинг каждые 6 месяцев. При отсутствии метилирования рекомендовано эндоскопическое исследование 1 раз в год.

Ключевые слова: метилирование, ДНК, ПЦР, гены, молекулярно-генетический, хронический атрофический гастрит, APC, E-кадгерин.

Abstract

Aim of research. To determine diagnostic role of DNA methylation of specific genes in detecting of early stages of transformation of chronic atrophic gastritis into gastric cancer

Materials and methods. The study included 56 patients with chronic atrophic gastritis. To determine the early stages of chronic atrophic gastritis into gastric cancer transformation

pathways all patients underwent investigation of APE, E-codein, hMLAI and TIMP3 genes' DNA methylation, which were performed on the biopsy material taken from mucosal tissue of stomach or from the venous blood samples.

Results and discussion. Complete DNA methylation of specific genes was identified in 9 (16,1%) patients, DNA methylation of 2 genes was found in 2 patients, DNA methylation of 3 and 4 genes was observed in 1 patient each. These investigations were performed on biopsy material and also on blood samples, diagnostic agreement between them constituted 66,6% and disagreement 33,3%. In 2 patients was identified gastric cancer T_{4b}N₀M₀ and they underwent surgical treatment.

Keywords: atrophic gastritis, chronic, gene, DNA methylation, early detecting, gastric cancer.

ВВЕДЕНИЕ

Хронический гастрит (ХГ) является самым распространенным (от 50 до 80% взрослого населения земного шара) заболеванием желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), которое морфологически характеризуется наличием воспалительных и дистрофических процессов в слизистой оболочке желудка (СОЖ) с явлениями нарушения клеточного обновления, прогрессирующей атрофией, функциональной и структурной перестройкой с разнообразными клиническими признаками [2]. При этом самостоятельный диагноз «хронический атрофический гастрит» большого прямого клинического значения не имеет и находится в contradикции с пониманием данной нозологии морфологами и клиницистами. Проблема хронического атрофического гастрита (ХАГ), встречающегося в 5% случаев у лиц моложе 30 лет, до настоящего времени остается актуальной [3]. Сегодня известно, что ХАГ является морфологическим фенотипом и результатом длительной инфекции *H. Pylori* (с небольшим исключением) у более половины инфицированных лиц [6]. При этом атрофия является наиболее важным независимым фактором риска аденокарциномы желудка, т.е. предраковым состоянием, особенно при развитии кишечной метаплазии, коррелируя со степенью и топографией атрофических изменений [5].

С клинических позиций известно, что 25–75% всех видов РЖ возникают на фоне ХАГ, т.е. последний занимает одно из лидирующих мест в структуре предраковых состояний. Примерно у 10% пациентов с ХАГ в течение 15 лет развивается РЖ [4]. Неуклонное прогрессирование атрофии СОЖ у пациентов с ХГ само по себе не приводит к ухудшению общего состояния пациента, однако может быть фоном для развития других более тяжелых заболеваний. Развитие кишечной метаплазии и последующей дисплазии является ключевым моментом в развитии рака и лимфопролиферативных процессов в желудке. Каскад патологических явлений в качестве модели развития РЖ предложил в 1988 г. Р. Соггеа. Этапы «каскада Соггеа» сегодня рассматриваются как предраковые изменения СОЖ, т.е. морфологические изменения с высоким риском трансформации в РЖ.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Улучшить результаты ранней диагностики рака желудка у пациентов с хроническим атрофическим гастритом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с 2015 по 2017 г. исследование проведено у 60 пациентов с установленным хроническим атрофическим гастритом. Мужчин – 34 (56,7%), женщин – 26 (43,3%). Возраст пациентов колебался от 23 до 76 лет. Диагноз ХАГ установлен на основании клиничко-эндоскопических и морфологических данных. Анамнез заболеваемости составил от 7 до 8 лет, в среднем – 4,6 года. С целью определения процесса трансформации в неинвазивный рак желудка всем пациентам проведено молекулярно-генетическое исследование. Цель исследования – определение участка метилирования ДНК в АРС, Е-кадгерин, hMLH1 и TINP3 генах. Предметом исследования являлся участок слизистой желудка, взятый во время эндоскопического исследования из 3 точек, и кровь в количестве 5 мл. Исследование проводилось перекрестным методом во взятых образцах слизистой желудка и крови для достоверности полученных результатов.

Образцы слизистой желудка и крови помещают в специальный контейнер и тут же отправляют в лаборатории ПЦР для проведения исследования по определению уровня метилирования ДНК в АРС, Е-кадгерин, hMLH1 и TINP3- гена. Материалом для выделения ДНК служит плазма, полученная из образцов венозной крови методом центрифугирования. Биологический материал не менее 5 мг помещают в специальную пробирку с физиологическим раствором не менее 50 мкл. Выделение ДНК проводится согласно стандартному методу ZymoResearchD 500IEZDNAMethylationKit. Типирование образцов ДНК проводится с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров, а также с использованием набора для проведения ПЦР-РВ R-412.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно ПЦР исследованию, из 60 образцов биопсийного материала и крови тотальное гипометилирование выявлено всего у 10 (16,6%) пациентов. Из них метилирование только одного АРС-гена выявлено у 3 пациентов (рис. 1),

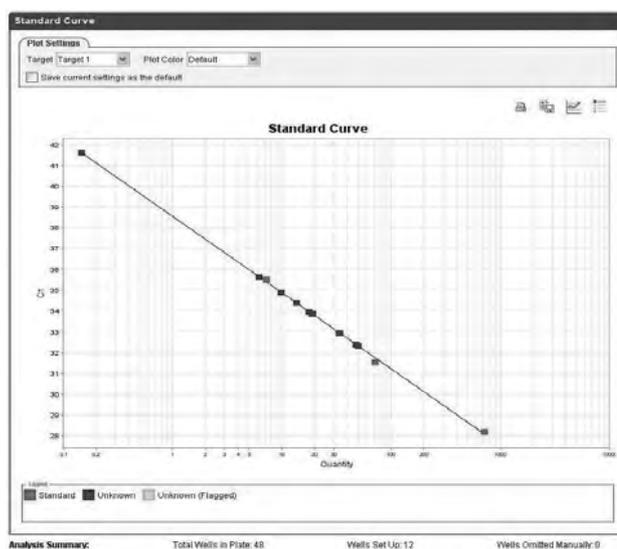


Рис. 1. Стандартный график концентраций метилированной ДНК

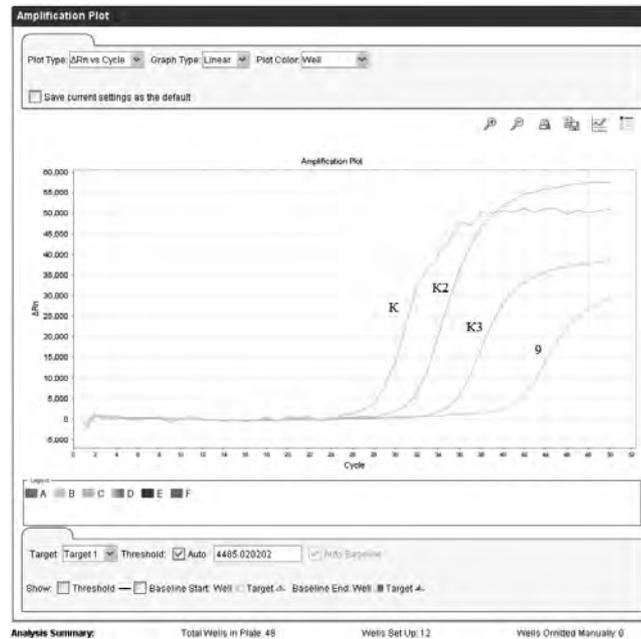


Рис. 2. Исследуемый образец из группы пациентов был проверен на наличие метилирования гена APC. График флуоресценции ПЦР-РВ показывает наличие неметилированного гена APC у данного пациента

метилование E-кадгерина – у 2, метилирование hMLH1-гена – у 1, метилирование гена T1NP3 не выявлено. Метилование двух генов APC и E-кадгерина выявлено у 3 пациентов. Положительные тесты на метилирование сразу 4 исследуемых генов были у 1 пациента, а 3 генов, за исключением гена T1NP3, тоже наблюдали у 1 пациента. У остальных 50 пациентов участков метилирования ДНК не выявлено (рис. 2). При сопоставлении результатов биопсийного материала с образцами крови частота соответствия составила у 7 (77,7%) пациентов из 10, в 3 (33,3%) случаях были получены отрицательные результаты.

Молекулярно-генетическое исследование согласно протоколу этим пациентам будет проведено через 6 месяцев.

Исходя из полученных данных, при выявлении двух и более генов у пациентов с ХАГ рекомендовано эндоскопическое исследование раз в 3 месяца, а при гипометилировании одного гена – раз в 6 месяцев. В течение 1,5 года у 2 пациентов с высоким уровнем метилирования 3 и 4 генов выявлен рак желудка в стадии T_{1b}N₀M₀, произведено оперативное вмешательство в объеме субтотальной резекции желудка. Под наблюдением находятся еще 7 пациентов, которых повторно исследовали спустя 3 и 6 месяцев, что также подтверждает наличие участка гипометилирования ДНК.

ВЫВОДЫ

1. Одним из современных методов ранней диагностики рака желудка, развившегося на фоне хронического атрофического гастрита, является молекулярно-генетическое исследование по определению метилирования ДНК в исследуемых четырех наиболее информативных генах.

2. Наличие участков метилирования ДНК в двух и более генах повышает риск возникновения рака желудка у пациентов с хроническим атрофическим гастритом.
3. Прогноз результатов достоверно повышается, если в исследуемых двух объектах результаты исследования будут соответствовать.

ЛИТЕРАТУРА

1. Goncharik I. (2002) *Hronicheskii gastrit: prakt. posobie* [Hronicheskii gastritis: pract. allowance]. Minsk: BGMU. Goncharik I.I. Prakt. Posobie. Mn.: Uradzhai, 32 p.
2. Mosiichuk L. (2010) Hronicheskii gastrit: sovremennii vzglyad na problem [Chronic gastritis: a modern view on the problem]. *Novosti meditsini i farmatsii. Gastroenterologiya*, 377 p.
3. Pavlovich I.M. (2006) *Atroficheskii gastrit (klinicheskaya i funktsional'naya morfologicheskaya harakteristika, faktori riska opuholevoi transformatsii)* [Atrophic gastritis (clinical, functional and morphological characteristics, risk factors of malignant transformation)] (PhD Thesis). SPb., 46 p.
4. Shmak A.I. (2011) Rak zheludka. Zabolevaemost' rakom zheludka v nashei strane v sravnenii s drugimi stranami [Cancer of the stomach. The incidence of gastric cancer in our country compared to other countries]. *Konspekt vracha*, no 26 (1017), p. 13.
5. Rugge M., Correa P., Di Mario F., El-Omar E., Fiocca R., Ge-boes K., Genta R.M. (2008) OLGA staging for gastritis: A tutorial. *Digestive and Liver Disease*, vol. 40, pp. 650–658.
6. Sipponen P., Kekki M., Haapakoski J., Ihamaki T., Siu-rala M. (1985) Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: statistical calculations of cross-sectional data. *Int. J. Cancer*, vol. 35, pp. 173–177.

Поступила/Received: 02.05.2017
 Контакты/Contacts: dasik86@mail.ru

Требования к оформлению научных статей, предоставляемых авторами для публикации

Редакция рассматривает статьи, нигде ранее не публиковавшиеся и не предоставленные для публикации в другие редакции.

Авторские материалы принимаются редакцией на условиях: однократной публикации в одном журнале; переделки или иной переработки, а также подбора и расположения авторских материалов в журнале; безвозмездной уступки авторских прав на данный материал в порядке неисключительной лицензии, размещаемый по усмотрению редакции в электронных библиотеках.

Все статьи, поступающие в редакцию, проходят многоступенчатое рецензирование. Замечания рецензентов направляются автору без указания имен рецензентов. После получения рецензий и ответов автора редколлегия принимает решение о публикации (или отклонении) статьи. Редакция оставляет за собой право отклонить статью без указания причин. Очередность публикации устанавливается в соответствии с редакционным планом издания журнала. Небольшие исправления стилистического, номенклатурного и формального характера вносятся в статью без согласования с автором. Если статья перерабатывалась автором в процессе подготовки к публикации, датой поступления считается день поступления окончательного текста.

Статья должна быть предоставлена в редакцию в электронной версии с подписями авторов. Статья должна сопровождаться письмом-заявлением.

Упомянутые в статье лекарственные средства или изделия медицинского назначения должны иметь действующую регистрацию в стране проведения исследования, а способы их применения – соответствовать утвержденной инструкции либо иметь разрешение на проведение клинического исследования. В статье должны использоваться только международные наименования лекарственных средств (за исключением статей, публикующихся с пометкой «На правах рекламы»).

Статья должна содержать: код УДК; название; фамилию, имя, отчество (полностью) каждого автора с указанием места работы; контактную информацию для публикации в свободном доступе для общения читателей с автором (почтовый адрес, телефон, e-mail); резюме (аннотацию) объемом 100–250 слов (не более 3000 знаков); ключевые слова на русском языке.

На английском языке необходимо предоставить название статьи, резюме, ключевые слова, указать фамилию, имя, отчество автора и место работы.

Электронная версия статьи должна быть создана с помощью текстового редактора Microsoft Word любой версии.

Ориентация – книжная.

Шрифт – Times New Roman.

Кегель – 12 пунктов.

Междустрочный интервал – полуторный.

Расстановка переносов – переносов нет.

Форматирование – в параметре «по ширине».

Цвет шрифта – черный.

Отступ (красная строка) – 1,5 см.

При наборе основного текста не допускается установление двух и более символов «пробел» подряд, абзацных и других отступов с помощью клавиши «Табуляция», отступа (пробела) между словом и символами «точка», «запятая», «кавычка», «скобка».

Заголовки и подзаголовки набираются полужирным шрифтом с выравниванием слева, точка в конце заголовка не ставится. Иного форматирования (выделения курсивом, подчеркиванием) в тексте статьи не допускается. Перед заголовками оставляется один абзацный отступ.

Нумерованный и маркированный списки формируются только автоматически.

Названия схем и рисунков помещают под ними, выравнивают слева, в две строки номер и собственно название рисунка или схемы.

Таблицы должны иметь название, быть компактными, наглядными, заголовки граф должны точно соответствовать их содержанию, иметь ссылки в тексте. Все цифры в таблицах должны соответствовать цифрам в тексте.

Таблица должна быть создана в текстовом редакторе Microsoft Word любой версии. Название таблицы помещают над таблицей слева, без абзацных отступов: ее номер и собственно название. В конце заголовков и подзаголовков таблиц точки не ставятся. После таблицы текст размещается с одним абзацным отступом.

Математические и химические формулы должны быть написаны очень четко, с указанием на полях букв алфавита (строчных, прописных, греческих, латинских), показателей степени, индексов надстрочных и подстрочных.

Аббревиатуры, приводимые в статье, должны быть расшифрованы при первом упоминании.

Библиография должна быть приведена в конце статьи. В самом тексте следует указывать только номер ссылки в квадратных скобках цифрами. Ссылки нумеруются в порядке цитирования. За точность библиографии несет ответственность автор. Список литературы ограничен 30 источниками для оригинального исследования и 50 – для обзора.

С методическими рекомендациями по оформлению транслитерированного (и переведенного) при-статейного списка литературы и образцами оформления основных видов литературных источников можно ознакомиться на сайте издательства www.recipe.by

При условии соблюдения всех указанных выше требований статья должна быть отправлена на электронный адрес редакции интересующего вас журнала, который указан на странице каждого из изданий.

Предоставление статьи для публикации в журналах УП «Профессиональные издания» подразумевает согласие автора(ов) с опубликованными правилами.