

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ
МЕДИЦИНСКИХ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ

Издается с мая 2002 г.

Учредитель:
Учреждение РАМН
Научно-исследовательский
институт онкологии СО РАМН

Индекс по каталогу «Роспечать» – 46827

www страница:
www.oncology.tomsk.ru/nii/journal/

Электронная версия журнала
также представлена на сайтах:
www.rosoncweb.ru/journals/sib_oncology/
<http://elibrary.ru/>

Адрес редакции:
634050, г. Томск,
пер. Кооперативный, 5
e-mail: AfanasyevSG@oncology.tomsk.ru
тел.: (3822) 418089, 513269
факс: (3822) 418060, 511039

Редакторы:
В.С. Сумарокова, Е.В. Лукина
Верстка



Подписано в печать 14.07.2014 г.
Формат 84x108/16.

Бумага офсетная №1. Печать офсетная.
Гарнитура Times New Roman Cyr
Печ. л. 5,5; усл. печ. л. 9,3; уч.-изд. л. 9,0.
Тираж 1000 экз. Заказ.

Учебная производственная типография ТГУ, 634050,
г. Томск, пр. Ленина, 66.

СИБИРСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

SIBERIAN JOURNAL OF ONCOLOGY

SIBIRSKIY ONCOLOGICHESKIY ZHURNAL

Двухмесячный научно-практический журнал

№ 3

2014

Журнал зарегистрирован 20.03.2003 г. в Министерстве Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций. Свидетельство № 77-14937

Журнал включен в Перечень ведущих рецензируемых научных изданий, выпускаемых в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (решение ВАК РФ № 6/6 от 19.02.10)

Журнал включен в Реферативный журнал и базы данных ВИНТИ, БД «Российский индекс научного цитирования». Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной справочной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals Directory»

Генеральный спонсор журнала
ООО Медицинская компания
«Томскинтерсервис»

При перепечатке ссылка
на «Сибирский онкологический журнал» обязательна

Главный редактор –

Е.Л. Чойнзоннов, *д.м.н., академик РАН, профессор*

Заместители главного редактора –

В.Е. Гольдберг, *д.м.н., профессор*

Н.В. Чердынцева, *д.б.н., профессор*

Отв. секретарь –

С.Г. Афанасьев, *д.м.н., профессор*

Члены редколлегии:

Л.А. Коломиец, *д.м.н., профессор*

И.В. Кондакова, *д.м.н., профессор*

С.А. Некрылов, *д.и.н., профессор*

В.А. Новиков, *д.м.н.*

И.Н. Одинцова, *д.м.н., профессор*

В.М. Перельмутер, *д.м.н., профессор*

Е.М. Слонимская, *д.м.н., профессор*

Ж.А. Старцева, *д.м.н.*

С.А. Тузиков, *д.м.н., профессор*

В.В. Удут, *д.м.н., член-корр. РАМН, профессор*

Л.Н. Уразова, *д.б.н., профессор*

И.Г. Фролова, *д.м.н., профессор*

О.В. Черемисина, *д.м.н.*

Е.П. Черных, *д.м.н., член-корр. РАМН, профессор*

Иностранные члены редколлегии:

И.Б. Щепотин (*Украина*)

Cheung Tak-Hong (*Гонконг, Китай*)

S. Iyer (*Индия*)

V. Kesic (*Хорватия*)

T. Kondo (*Япония*)

Yu. G. Kzhyshkovska (*Германия*)

G. Margolin (*Швеция*)

J. Shah (*США*)

L. Ungar (*Венгрия*)

A. Yu (*Тайвань*)

M. Zhugashvili (*Испания*)

Редакционный совет:

А.В. Важенин (*Челябинск*)

М.В. Волков (*Владивосток*)

В.В. Дворниченко (*Иркутск*)

Ю.А. Дыхно (*Красноярск*)

П.Д. Каратаев (*Якутск*)

В.Л. Коваленко (*Хабаровск*)

С.А. Коломиец (*Кемерово*)

В.К. Косенок (*Омск*)

А.Ф. Лазарев (*Барнаул*)

С.В. Лесков (*Чита*)

А.А. Модестов (*Красноярск*)

А.П. Перинов (*Улан-Удэ*)

С.В. Сидоров (*Новосибирск*)

С.Н. Тараканов (*Магадан*)

Editor-in-chief –

E.L. Choynzonov, *DSc, Academician of RAS, Professor*

Deputy Editor-in-chief –

V.G. Goldberg, *DSc, Professor*

N.V. Cherdyntseva, *DSc, Professor*

Executive secretary –

S.G. Afanasyev, *DSc, Professor*

Editorial members:

L.A. Kolomiets, *DSc, Professor*

I.V. Kodakova, *DSc, Professor*

S.A. Nekrylov, *DSc, Professor*

V.A. Novikov, *DSc*

I.N. Odintsova, *DSc, Professor*

V.M. Perelmuter, *DSc, Professor*

E.M. Slonimskaya, *DSc, Professor*

Zh.A. Startseva, *DSc*

S.A. Tuzikov, *DSc, Professor*

V.V. Udut, *DSc, Associate Member of RAMS, Professor*

L.N. Urazova, *DSc, Professor*

I.G. Frolova, *DSc, Professor*

O.V. Cheremisina, *DSc*

E.P. Chernykh, *DSc, Associate Member of RAMS, Professor*

Foreign editorial members:

I.B. Shchepotin (*Ukraine*)

Cheung Tak-Hong (*Hong-Kong, China*)

S. Iyer (*India*)

V. Kesic (*Croatia*)

T. Kondo (*Japan*)

Yu. G. Kzhyshkovska (*Germany*)

G. Margolin (*Sweden*)

J. Shah (*USA*)

L. Ungar (*Hungary*)

A. Yu (*Taiwan*)

M. Zhugashvili (*Spain*)

Editorial committee:

A.V. Vazhenin (*Chelyabinsk*)

M.V. Volkov (*Vladivostok*)

V.V. Dvornichenko (*Irkutsk*)

Yu.A. Dykhno (*Krasnoyarsk*)

P.D. Karataev (*Yakutsk*)

V.L. Kovalenko (*Khabarovsk*)

S.A. Kolomiets (*Kemerovo*)

V.K. Kosenok (*Omsk*)

A.F. Lazarev (*Barnaul*)

S.V. Leskov (*Chita*)

A.A. Modestov (*Krasnoyarsk*)

A.P. Perinov (*Ulan-Ude*)

S.V. Sidorov (*Novosibirsk*)

S.N. Tarakanov (*Magadan*)

СОДЕРЖАНИЕ

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

<i>Брагина О.Д., Слонимская Е.М., Завьялова М.В., Телегина Н.С., Перельмутер В.М., Тарабановская Н.А., Дорошенко А.В.</i> Предсказательное значение ряда молекулярных параметров у больных базальноподобным трипл-негативным раком молочной железы -----	5
<i>Соловьева Е.П., Асахин С.М., Вальков М.Ю.</i> Клиническая значимость задержки старта специального лечения у больных неоперабельным немелкоклеточным раком лёгкого III стадии: результаты собственного исследования и литературный обзор -----	11

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

<i>Литвяков Н.В., Цыганов М.М., Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М., Ивановская П.В., Ибрагимова М.К., Гарбуков Е.Ю., Коростелев С.А., Потапова О.Ю., Чойнзонов Е.Л.</i> Микроматричный анализ аномалий числа копий ДНК опухоли молочной железы: связь с эффектом неоадьювантной химиотерапии -----	19
<i>Никитина Е.Г., Уразова Л.Н., Черемисина О.В., Кульбакин Д.Е., Стегний В.Н.</i> Вариабельность и уровень экспрессии микроРНК в ткани опухолей головы и шеи -----	28
<i>Дьячкова Ю.А., Долгих Т.Ю., Домникова Н.П.</i> Клинико-патоморфологическое исследование миелофиброза при множественной миеломе -----	34
<i>Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Бабышкина Н.Н., Паталяк С.В.</i> Роль морфологических и генетических особенностей строения рецепторов эстрогенов альфа в развитии резистентности к эндокринотерапии тамоксифеном у пациенток с люминальным раком молочной железы -----	39
<i>Кондакова И.В., Какурина Г.В., Спирина Л.В., Черемисина О.В., Панкова О.В., Меньшиков К.Ю.</i> Оценка внеклеточного и внутриклеточного протеолиза при предопухолевых и опухолевых заболеваниях гортани -----	45

ОПЫТ РАБОТЫ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ

<i>Надеев А.П., Жукова В.А., Козяев М.А., Травин М.А., Яценко К.Е.</i> Опыт использования иммуногисто-химического метода в дифференциальной диагностике опухолей центральной нервной системы -----	51
--	----

ОБЗОРЫ

<i>Абакушина Е.В., Абакушин Д.Н., Анохин Ю.Н.</i> Экспериментальные и клинические подходы к радиоиммунотерапии в онкологии -----	56
<i>Григорьев Е.Г., Фролова И.Г., Усынин Е.А., Величко С.А., Окунев В.В., Гольдберг А.В.</i> Рак мочевого пузыря: возможности высокопольной магнитно-резонансной томографии (обзор литературы) -----	65

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Волкоморов В.В., Григорьева Е.С., Карбышев М.С., Митрофанова И.В., Кайгородова Е.В., Чердынцева Н.В.</i> Новое моноклональное антитело для детекции опухоль-ассоциированного белка РМЕРА1 -----	72
<i>Манских В.Н., Ганчарова О.С.</i> Смешанная мезотелиома плевры с метастазированием в миокард у мыши BALB/C -----	78

СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

<i>Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Фесик Е.А., Мерзлякова М.К.</i> Рак шейки матки на фоне замершей беременности -----	81
---	----

ЮБИЛЕИ

К 70-летию юбилею академика медицинского отделения Академии наук Молдовы Г.А. Цыбырнэ -----	86
---	----

CONTENTS

CLINICAL STUDIES

- Bragina O.D., Slonimskaya E.M., Zavyalova M.V., Telegina N.S., Perelmutter V.M., Tarabanovskaya N.A., Doroshenko A.V.* Predictive value of molecular parameters in patients with basal-like tripl-negative breast cancer ----- 5
- Solovyeva E.P., Asakhin S.M., Valkov M.Yu.* Clinical significance of the delay in starting special treatment for patients with satge iii inoperable non-small cell lung cancer: results of study and literature review ----- 11

LABORATORY AND EXPERIMENTAL STUDIES

- Litviakov N.V., Tsyganov M.M., Cherdyntseva N.V., Slonimskaya E.M., Ivankovskaya P.V., Ibragimova M.K., Garbukov E.Yu., Korostelev S.A., Potapova O.Yu., Choinzonov E.L.* Microarray analysis of dna copy number aberration in breast tumor: correlation with the efficacy of neoadjuvant chemotherapy ----- 19
- Nikitina E.G., Urazova L.N., Cheremisina O.V., Kulbakin D.E., Stegnyy V.N.* Variability and microrna expression level in tissues of head and neck tumors ----- 28
- Dyachkova Yu.A., Dolgikh T.Yu., Domnikova N.P.* Clinico-pathomorphological study of myelofibrosis in multiple myeloma ----- 34
- Slonimskaya E.M., Vtorushin S.V., Babyshkina N.N., Patalyak S.V.* Role of morphological and genetic structural characteristics of estrogen receptor alpha in the development of resistance to endocrinotherapy with tamoxifen in patients with luminal breast cancer ----- 39
- Kondakova I.V., Kakurina G.V., Spirina L.V., Cheremisina O.V., Pankova O.V., Menshikov K.Yu.* Assessment of extracellular and intracellular proteolysis in pretumor and tumor diseases of the larynx ----- 45

PRACTICE OF ONCOLOGY

- Nadeev A.P., Zhukova V.A., Kozyaev M.A., Travin M.A., Yatsenko K.E.* Experience in using immunohistochemical method in differential diagnosis of central nervous system tumors ----- 51

REVIEWS

- Abakushina E.V., Abakushin D.N., Anohin Ju.N.* Experimental and clinical approaches to a radioimmunotherapy in oncology ----- 56
- Grigoryev E.G., Frolova I.G., Usynin E.A., Velichko S.A., Okunev V.V., Goldberg A.V.* Role of high-field magnetic resonance imaging in diagnosis of bladder cancer (Literature review) ----- 65

SHORT REPORTS

- Volkomorov V.V., Grigoryeva E.S., Karbyshev M.S., Mitrofanofa I.V., Kaigorodova E.V., Cherdyntseva N.V.* New monoclonal antibody for tumor-associated protein pmepa1 detection ----- 72
- Manskikh V.N., Gancharova O.S.* Mixed pleural mesothelioma with myocardial metastasis in balb/c mouse ----- 78

CASE FROM CLINICAL PRACTICE

- Chernyshova A.L., Kolomiets L.A., Fesik E.A., Merzlyakova M.K.* Coexistence of cervical cancer and missed abortion ----- 81

JUBILEES

- To the 70-th anniversary of Georgy A. Tsybyrne, Academician of Medical Branch of Academy of Sciences of Moldova ----- 86

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 618.19-006.6-091-037

ПРЕДСКАЗАТЕЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЯДА МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПАРАМЕТРОВ У БОЛЬНЫХ БАЗАЛЬНОПОДОБНЫМ ТРИПЛ-НЕГАТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О.Д. Брагина¹, Е.М. Слонимская^{1,2}, М.В. Завьялова^{1,2}, Н.С. Телегина²,
В.М. Перельмутер^{1,2}, Н.А. Тарабановская¹, А.В. Дорошенко¹

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹

*ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск²
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: rungis@mail.ru¹*

Актуальность: достижение полной морфологической регрессии (ПМР) является предиктором благоприятного исхода у больных трипл-негативным раком молочной железы. В последние годы все большее внимание уделяется поиску маркеров, которые позволяют прогнозировать данный ответ опухоли на неoadъювантную химиотерапию (НАХТ).

Цель исследования: оценка предсказательной значимости ряда молекулярных параметров (цитокератина 5/6, эпидермального фактора роста EGFR1 и маркера клеточной пролиферации Ki-67) у больных базальноподобным трипл-негативным раком молочной железы.

Материал и методы. В исследование было включено 44 больных базальноподобным трипл-негативным раком молочной железы, получивших 2–4 курса НАХТ по схемам FAC и CAX. У всех больных в биопсийном материале опухоли определялись рецепторный статус (РЭ, РП, Her-2/neu), уровень пролиферативной активности Ki-67, CK 5/6 и эпидермальный фактор роста EGFR1 (шкала Nielsen). Оценка эффективности НАХТ осуществлялась по шкале RECIST.

Результаты. Наибольшее количество ПМР отмечено у больных с трипл-негативным РМЖ, в опухолевой ткани которых выявлена экспрессия только EGFR1 (69 %, $p=0,01$). К наиболее значимым характеристикам данного параметра относятся высокий уровень (72 %, $p=0,02$); умеренная или выраженная экспрессия (90 %, $p=0,02$). При этом лучший ответ отмечался при высокой пролиферативной активности опухолевых клеток (90 %, $p=0,0006$) и при использовании схемы CAX (81 %, $p=0,004$). Разработанная модель логистической регрессии позволяет прогнозировать частоту ПМР с высокими показателями чувствительности (82 %) и специфичности (67 %).

Выводы. Полученные результаты позволяют рассматривать изученные маркеры в качестве предиктивных параметров, а разработанная модель логистической регрессии – оценивать ожидаемую эффективность в виде достижения ПМР и планировать лечение.

Ключевые слова: рак молочной железы, неoadъювантная химиотерапия, предиктивные факторы прогноза.

PREDICTIVE VALUE OF MOLECULAR PARAMETERS IN PATIENTS WITH BASAL-LIKE TRIPL-NEGATIVE BREAST CANCER

O.D. Bragina¹, E.M. Slonimskaya^{1,2}, M.V. Zavyalova^{1,2}, N.S. Telegina²,
V.M. Perelmutter^{1,2}, N.A. Tarabanovskaya¹, A.V. Doroshenko¹

Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk¹

Siberian State Medical University, Tomsk²

5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia, e-mail: rungis@mail.ru¹

Background: Pathological complete response is a predictor of favorable clinical outcome in patients with tripl-negative breast cancer. Over the last years there was an increasing interest to the search for predictive markers of tumor response to neoadjuvant chemotherapy (NACH).

The purpose of the study is to assess predictive markers: cytokeratin 5/6, epidermal growth factor receptor (EGF1) and proliferation marker Ki-67 in patients with basal-like tripl-negative breast cancer.

Materials and methods: The study included 44 patients with basal-like tripl-negative breast cancer, who received 2–4 courses of NACH with FAC and CAX regimens. Estrogen and progesterone receptors, Her-2/neu, the levels of proliferative activity of Ki-67, CK 5/6 and EGFR1 were determined in all breast cancer biopsies. Response to NACH was assessed using RECIST scale.

Results. Pathological complete response was observed in 69 % of breast cancer patients, who had only EGFR1 expression in tumor tissue ($p=0.01$). The best response was noted at high proliferative activity of tumor cells (90 %, $p=0.0006$) and when using CAX regimen (81 %, $p=0.004$). The model of logistic regression enables prediction of pathological complete response with high rates of sensitivity (82 %) and specificity (67 %).

Conclusion. The results obtained indicate that the studied markers can be used as predictors of clinical outcome and the devised model of logistic regression can be used to predict the chemotherapy response of breast cancer based on clinical pathological variables.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, predictive markers.

Трипл-негативный рак (ТНР) молочной железы характеризуется отсутствием экспрессии к рецепторам стероидных гормонов (эстрогену и прогестерону) и Her-2/neu [9, 19]. Большинство из этих опухолей имеют достаточно агрессивное клиническое течение, проявляющееся высокой частотой гематогенного метастазирования, преимущественно в легкие и головной мозг, и ассоциируются с низкими показателями безрецидивной и общей выживаемости по сравнению с другими подтипами рака молочной железы (РМЖ) [1, 2, 6]. Тем не менее накопленные к настоящему моменту знания позволяют говорить о ТНР как о гетерогенной группе, имеющей различные морфологические и молекулярные особенности, а также биологическое течение [7]. B.D. Lehmann et al. [14] посредством транскрипторного анализа идентифицировали 6 подтипов трипл-негативного рака, имеющих различный генный набор, выделяя базальноподобные подтипы 1 и 2, иммуномодуляторный, мезенхимальный, подобный стволовым клеткам и люминальный андрогенный.

Однако в клинической практике при определении варианта ТНР до настоящего времени выделяют 2 основных подтипа: базальноподобный и небазальноподобный, поскольку, прежде всего, они ассоциированы с различным исходом заболевания [20]. Базальноподобные опухоли встречаются примерно у 50–75 % [19], а по некоторым данным, и до 85 % больных трипл-негативным РМЖ [4]. Как правило, эти новообразования характеризуются высокими показателями пролиферативной активности, степени злокачественности, митотического индекса и имеют неблагоприятный прогноз [5, 13]. Показано, что мутации гена *BRCA1* значительно чаще (70–85%) выявляются при базальноподобном ТНР [25]. Идентификация подтипов ТНР осуществляется посредством использования ИГХ-

панели Nielsen, которая была разработана в 2004 г., позволяющий определять тройной отрицательный рецепторный статус (РЭ-, РП-, Her-2/neu-), экспрессию базального цитокератина 5/6 и эпидермального фактора роста EGFR1 [18].

В связи с отсутствием таргетных мишеней единственным методом системного лечения для больных с трипл-негативным раком молочной железы на сегодняшний день является конвенциональная химиотерапия [10]. Согласно международным рекомендациям (ASCO, ESMO, Сан-Галлен), в качестве наиболее предпочтительных рассматриваются схемы с включением антрациклинов (FAC, FEC), таксанов (T-FAC, AC-T, таксотер в монорежиме), препаратов платины и капецитабина [11]. Химиотерапия может проводиться как в нео-, так и в адьювантном режимах, при этом отсутствуют значимые различия в показателях выживаемости [3]. Однако проведение цитостатической терапии до операции позволяет у ряда пациенток добиться значимого уменьшения размеров опухоли, что способствует увеличению количества органосохраняющих операций и, что более значимо, позволяет оценить чувствительность опухоли к проводимому лечению [24]. Отмечено, что опухоли с тройным отрицательным рецепторным фенотипом обладают большей чувствительностью к химиотерапии по сравнению с другими подтипами РМЖ [21]. Но только достижение полных морфологических регрессий (ПМР) сопряжено с более высокими показателями выживаемости, аналогичными тем, которые наблюдаются при люминальных опухолях [15].

Поскольку ответ опухоли на лечение может быть различным, актуальным является поиск маркеров, которые могли бы с большей вероятностью прогнозировать ожидаемую эффективность химиотерапии. К сожалению, ни один из традиционно оценивае-

мых клинических параметров (возраст, состояние менструальной функции, распространенность опухолевого процесса) не может рассматриваться в качестве информативных предсказательных маркеров [16]. Аналогичная ситуация наблюдается и в отношении морфологических критериев. В литературе представлены отдельные публикации, касающиеся ответа различных гистологических форм ТНР на проводимую химиотерапию. Так, метастатическая карцинома молочной железы с тройным отрицательным фенотипом характеризуется меньшей чувствительностью к системному лечению по сравнению с инвазивным протоковым трипл-негативным РМЖ [17, 22].

В связи с этим все большее внимание уделяется изучению предсказательной значимости молекулярных маркеров, в том числе и самих подтипов ТНР. Согласно данным, опубликованным Н. Masuda et al., достижение полных морфологических регрессий при проведении системной химиотерапии значительно реже наблюдается у больных с базальноподобным подтипом опухоли по сравнению с небазальноподобным [16]. В то же время R. Rouzier et al., наоборот, показали, что уже сам по себе базальноподобный фенотип является предиктором в отношении большего количества ПМР [23]. В качестве предиктора эффективности предоперационной химиотерапии изучается значимость маркера клеточной пролиферации Ki-67. Отмечено, что количество полученных полных морфологических регрессий прямо пропорционально уровню пролиферативной активности [8, 12]. Однако эти исследования немногочисленны и нередко характеризуются противоречивыми результатами, а сама проблема требует дальнейшего изучения.

Цель исследования: оценка предсказательной значимости ряда молекулярных параметров (цитокератина 5/6, эпидермального фактора роста EGFR1 и маркера клеточной пролиферации Ki-67) у больных базальноподобным трипл-негативным раком молочной железы.

Материал и методы

В исследование было включено 44 больных базальноподобным трипл-негативным раком молочной железы ($T_{2-3}N_{0-2}M_0$), проходивших лечение на базе отделения общей онкологии ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН в период с 2007 по 2013 г. Средний возраст больных – $48 \pm 9,6$ года.

До начала лечения всем пациенткам проводилось полное клинико-инструментальное обследование, включающее клинический осмотр, УЗИ молочных желез, регионарных лимфатических узлов, печени, маммографию, рентгенографию и/или компьютерную томографию органов грудной клетки, остеосцинтиграфию. Все больные получали комплексное лечение. На первом этапе проводилась неоадьювантная химиотерапия (НАХТ) с использованием 2 схем: FAC (5-фторурацил 500 мг/м^2 , в 1-й день, адриамицин 50 мг/м^2 , в 1-й день, циклофосфамид 500 мг/м^2 , в 1-й день, внутривенно, через 21 день) и САХ (циклофосфан 100 мг/м^2 , внутримышечно в течение 14 дней, адриамицин 30 мг/м^2 , внутривенно в 1-й и 8-й дни, капецитабин 1000 мг/м^2 , 2 раза в день, per os, в течение 14 дней, через 21 день). В зависимости от эффекта пациентки получали 2–4 курса лечения. Далее выполнялось оперативное вмешательство в объеме секторальной резекции с аксиллярной лимфаденэктомией или радикальной мастэктомии. В адьювантном режиме проводилось 2–4 курса химиотерапии по схеме FAC, лучевая терапия назначалась по показаниям.

Морфологическому и иммуногистохимическому исследованию подвергались образцы опухолевой ткани биопсийного и операционного материала. Проводка и изготовление гистологических препаратов осуществлялись по стандартной методике. Препараты окрашивались гематоксилином и эозином. Гистологический тип рака устанавливался согласно рекомендациям ВОЗ (Женева, 2003).

Иммуногистохимическое исследование осуществлялось с использованием антител фирмы «Dako» к рецепторам эстрогена (клон 1D5, RTU, мышинные), рецепторам прогестерона (клон PgR636, RTU, мышинные) и онкопротеину c-erbB-2 (Her2/neu статус) (рабочее разведение 1:500, кроличьи). Определяли уровень маркера клеточной пролиферации Ki-67 (клон MIB-1, RTU, мышинные). Показатели менее 20 % оценивали как низкий, а 20 % и более – как высокий уровень. Определялась экспрессия CK 5/6 (клон D5/16 B4, рабочее разведение 1:100, мышинные, фирмы «Novocastra») и EGFR1 (клон SP9, рабочее разведение 1:600, кроличьи, фирмы Diagnostic BioSystems). Экспрессия оценивалась в процентном содержании положительно окрашенных клеток в 10 полях зрения на 1000 клеток при увеличении $\times 400$. Для эпидермального фактора роста EGFR1 анализировали уровень экспрессии

(менее 10 % – низкий, 10 % и более – высокий), ее локализацию (мембранная, цитоплазматическая или мембранно-цитоплазматическая) и интенсивность (слабая, умеренная, выраженная).

Непосредственная эффективность НАХТ оценивалась по шкале RECIST по данным клинического осмотра, УЗИ молочных желез и маммографии. Достижение полных морфологических регрессий устанавливалось по результатам гистологического исследования операционного материала (IV степень лекарственного патоморфоза). Статистическая обработка материала выполнялась с помощью пакета программ «Statistica 7.0 for Windows».

Результаты исследования и обсуждение

В связи с тем, что сочетание маркеров (СК 5/6 и EGFR1) у больных базальноподобным трипленегативным раком может быть различным, нами

было выделено 3 подгруппы: экспрессия в опухолевой ткани только СК 5/6 отмечена в 2 (6 %), экспрессия EGFR1 – в 24 (54 %), обоих параметров – в 18 (40 %) наблюдениях. В связи с малым количеством пациентов подгруппа с экспрессией только СК 5/6 в дальнейшем не рассматривалась. При оценке эффективности НАХТ лучший ответ в виде полных (69%) и частичных регрессий (58 %) отмечался у больных с экспрессией в ткани опухоли EGFR1 (табл. 1). Однако значимые различия были получены только в отношении ПМП ($p=0,01$).

Дальнейший анализ показал, что достоверно чаще ПМП отмечались при уровне экспрессии EGFR1 10 % и более в 72 % ($p=0,02$) наблюдений, а также при его умеренной и выраженной экспрессии – 90 % ($p=0,02$) и не зависели от локализации (табл. 2).

Таблица 1

Эффективность неоадъювантной химиотерапии в зависимости от экспрессии в опухоли маркеров EGFR1 и СК5/6

Подгруппы базальноподобного рака	Эффективность НАХТ			
	Полная регрессия	Частичная регрессия	Стабилизация	Прогрессирование
EGFR1	11 (69 %)	10 (58 %)	2 (33 %)	1 (33 %)
СК5/6 и EGFR1	5 (31 %)	7 (42 %)	4 (67 %)	2 (67 %)
p	0,01	0,1	0,1	0,3

Таблица 2

Частота полных морфологических регрессий в зависимости от основных характеристик EGFR1

Характеристика EGFR1	Подгруппы базальноподобного рака	
	EGFR1	СК5/6 и EGFR1
Уровень экспрессии EGFR1		
- менее 10 %	3 (28 %)	1 (25 %)
- 10 % и более	8 (72%)	4 (75 %)
p	0,02	0,7
Выраженность экспрессии EGFR1		
- слабая	2 (10 %)	0
- умеренная и выраженная	9 (90 %)	5 (100 %)
p	0,02	0,3
Локализация экспрессии EGFR1		
- цитоплазма	7 (63 %)	3 (37 %)
- мембрана и цитоплазма	4 (37 %)	5 (63 %)
p	0,1	0,1

Более значимые результаты были получены при дополнительной оценке пролиферативной активности опухоли. Так, наибольшее количество ПМР (90 %) наблюдалось у больных с высоким уровнем пролиферативной активности и экспрессией только EGFR1 ($p=0,0006$) (табл. 3).

Поскольку пациенты, вошедшие в исследование, получали химиотерапию по двум схемам – FAC и САХ (кселода), мы оценили частоту ПМР в зависимости от данного параметра, а также экспрессии маркеров EGFR1 и СК5/6 (табл. 4). Оказалось, что лучшие результаты были получены у больных, в опухоли которых определялась экспрессия только EGFR1, а при лечении использовали схему с включением капецитабина. Полные морфологические регрессии были достигнуты в 81 % наблюдений ($p=0,004$).

На основании полученных результатов была разработана модель логистической регрессии, позволяющая прогнозировать достижение полных морфологических регрессий у больных базальноподобным трипл-негативным раком молочной железы. В данную модель вошли такие показатели, как подтип базальноподобного рака, определяемый наличием экспрессии EGFR1 и СК 5/6, уровень экспрессии EGFR1, Ki-67 в биопсийном опухолевом материале и применяемая схема химиотерапии. Модель рассчитывается по формуле

$Y=(42,8 - 1,86X_1 - 9,3X_2 - 2,14X_3 + 3,19X_4)$, где Y – значение уравнения регрессии;

(42,8) – значение коэффициента регрессии свободного члена;

X_1 – подтипы базальноподобного трипл-негативного рака (1 – с экспрессией только СК 5/6; 2 – с экспрессией только EGFR1; 3 – с экспрессией СК 5/6 и EGFR1), (1,86) – значение коэффициента регрессии этого признака;

X_2 – уровень экспрессии EGFR1 (1 – высокий, 2 – низкий), (9,3) – значение коэффициента регрессии этого признака;

X_3 – уровень экспрессии Ki-67 (1 – низкий, 2 – высокий), (2,14) – значение коэффициента регрессии этого признака;

X_4 – схема химиотерапии (1 – FAC, 2 – САХ), (3,19) – значение коэффициента регрессии этого признака.

К наличию ответа на проведение НАХТ относится полная регрессия, к отсутствию – частичная регрессия, стабилизация и прогрессирование процесса. Значение вероятности достижения полных морфологических регрессий определяется по формуле

$$p = eY/(1 + eY),$$

где p – значение вероятности развития признака;

Y – значение уравнения регрессии;

e – математическая константа, равная 2,72.

При $p<0,5$ прогнозируют низкую вероятность достижения ПМР, при $p>0,5$ – высокую вероятность ПМР. Чувствительность представленной модели составила 82 %; специфичность – 67 %.

Таблица 3

Достижение полных морфологических регрессий в зависимости от уровня Ki-67, экспрессии маркеров EGFR1 и СК 5/6

Подгруппы базальноподобного рака	Уровень Ki-67		p
	Менее 20 %	20 % и более	
EGFR1	1 (10 %)	9 (90 %)	0,0006
СК5/6 и EGFR1	0	4 (100 %)	0,3

Таблица 4

Частота полных морфологических регрессий у больных исследуемых подгрупп в зависимости от выбранной схемы химиотерапии

Подгруппы базальноподобного рака	Схема химиотерапии		
	FAC	САХ	p
EGFR1	2 (19 %)	9 (81 %)	0,004
СК5/6 и EGFR1	0	5 (100 %)	0,3

Заключение

Проведенное исследование позволяет полагать, что такие молекулярные параметры, как эпидермальный фактор роста EGFR1 и маркер клеточной пролиферации Ki-67, можно рассматривать в качестве предикторов в отношении достижения полных морфологических регрессий у больных базальноподобным трипл-негативным раком молочной железы. Использование разработанной модели логистической регрессии позволяет с достаточно высокой вероятностью рассчитывать частоту достижения полных морфологических регрессий, что крайне важно и значимо для больных трипл-негативным раком молочной железы.

Исследование выполнено при поддержке грантам Президента Российской Федерации (договор 14.122.13.491-МД).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bruckaert O., Wildiers H., Floris G., Neven P. Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies // *Int. J. Womens Health*. 2012. Vol. 12 (4). P. 511–520. doi: 10.2147/IJWH.S18541.
2. Carey L., Winer E., Viale G., Cameron D., Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? // *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2010. Vol. 10 (7). P. 1–10. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.154.
3. Chen X., Li J., Gray W.H., Lehmann B.D., Bauer J.A., Shyr Y., Pietersen J.A. TNBCtype: A Subtyping Tool for Triple-Negative Breast Cancer // *Cancer Inform*. 2012. Vol. 11. P. 147–156. doi: 10.4137/CIN.S9983.
4. Cheang M.C., Voduc D., Bajdik C., Leung S., McKinney S., Chia S.K., Perou C.M., Nielsen T.O. Basal-like Breast Cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than Triple-negative phenotype // *Clin. Cancer Res*. 2008. Vol. 14 (5). P. 1368–1376. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1658.
5. Choo J.R., Nielsen T.O. Biomarkers for Basal-like Breast Cancer // *Cancers*. 2010. Vol. 2. P. 1040–1065. doi: 10.3390/cancers2021040.
6. De Ruijter T.C., Veeck J., De Hoon J.P., van Engeland M., Tjan-Heijnen V.C. Characteristics of triple-negative breast cancer // *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2011. Vol. 137 (2). P. 183–192. doi: 10.1007/s00432-010-0957-x.
7. Dreyer G., Vandrope T., Smeets A., Forceville K., Brouwers B., Neven P., Janssens H., Deraedt K., Moerman P., Van Calster B., Christiaens M.R., Paridaens R., Wildiers H. Triple-negative breast cancer; Clinical characteristics in the different histological subtypes // *Breast*. 2013. Vol. 22 (5). P. 761–766. doi: 10.1016/j.breast.2013.01.009.
8. Fasching P.A., Heusinger K., Haerle L., Niklos M., Hein A., Bayer C.M., Rauh C., Schulz-Wendtland R., Bani M.R., Schrauder M., Kahmann L., Lux M.P., Strehl J.D., Hartmann A., Dimmler A., Beckmann M.W., Wachter D.L. Ki-67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment // *BMC Cancer*. 2011. Vol. 11. P. 486. doi: 10.1186/1471-2407-11-486.
9. Gluz O., Liedtke C., Gottschalk N., Pusztai L., Nitz U., Harbeck N. Triple-negative breast cancer – current status and future directions // *Ann. Oncol*. 2009. Vol. 20. P. 1913–1927. doi: 10.1093/annonc/mdp492.
10. Hawk N., O'Regan R. Treatment of Triple-negative breast cancer // *Comm. Oncol*. 2010. Vol. 7. P. 328–332.
11. Isakoff S.J. Triple-negative Breast Cancer: Role of Specific Chemotherapy Agents // *Cancer J*. 2010. Vol. 16 (1). P. 53–61. doi: 10.1097/PPO.0b013e3181d24ff7.
12. Keam B., Im S.-A., Lee K.-H., Han S.-W., Oh D.-Y., Kim J. H., Lee S.-H., Han W., Kim D.-W., Kim T.-Y., Park I. A., Noh D.-Y., Heo D. S., Bang Y.-J. Ki-67 can be used for further classification of triple-negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis // *Breast Cancer Res*. 2011. Vol. 13. R2. P. 1–7. doi: 10.1186/bcr2834.
13. Kreike B., van Kouwenhove M., Horlings H., Weigelt B., Peterse H., Bartelink H., van de Vijver M.J. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas // *Breast Cancer Res*. 2007. Vol. 9 (5). R. 65.
14. Lehmann B.D., Bauer J.A., Chen X., Sanders M.E., Chakravarthy A.B., Shyr Y., Pietersen J.A. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies // *J. Clin. Invest*. 2011. Vol. 121 (7). P. 2750–2767. doi: 10.1172/JCI45014.
15. Liedtke C., Mazouni C., Hess K.R., Sanders M.E., Chakravarthy A.B., Shyr Y., Pietersen J.A. Response to Neoadjuvant therapy and Long-Term survival in patients with Triple-negative breast cancer // *J. Clin. Oncol*. 2008. Vol. 28 (8). P. 1–18. doi: 10.1172/JCI45014.
16. Masuda H., Masuda N., Kodama Y., Ogawa M., Karita M., Yamamura J., Tsukuda K., Doihara H., Miyoshi S., Mano M., Nakamori S., Tsujinaka T. Predictive factors for the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy and prognosis in triple-negative breast cancer patients // *Cancer Chemother. Pharmacol*. 2011. Vol. 67. P. 911–917. doi: 10.1007/s00280-010-1371-4.
17. Montagna E., Maisonneuve P., Rotmensz N., Cancelli G., Iorfida M., Balduzzi A., Galimberti V., Veronesi P., Luini A., Pruneri G., Bottiglieri L., Mastropasqua M. G., Goldhirsch A., Viale G., Colleoni M. Heterogeneity of triple-negative breast cancer: histologic subtyping to inform the outcome // *Clin. Breast Cancer*. 2013. Vol. 13 (1). P. 31–39. doi: 10.1016/j.clbc.2012.09.002.
18. Nielsen T.O., Hsu F.D., Jensen K., Cheang M., Karaca G., Hu Z., Hernandez-Boussard T., Livasy C., Cowan D., Dressler L., Akslen L.A., Ragaz J., Allen M.G., Gilks C.B., van de Rijn M., Perou C.M. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-like Subtype of Invasive Breast Carcinoma // *Clin. Cancer Res*. 2004. Vol. 10. P. 5367–5374. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0220.
19. Perou C.M. Molecular Stratification of Triple-negative Breast Cancer // *The Oncologist*. 2011. Vol. 16 (1). P. 61–70. doi: 10.1634/theoncologist.2011-S1-61.
20. Rakha E.A., Elsheikh S.E., Aleksandarany M.A., Habashi H.O., Green A.R., Powel D.G., El-Sayed M.E., Benhasouna A., Brunet J.-S., Akslen L.A., Evans A.J., Blamey R., Reis-Filho J.S., Foulkes W.D., Ellis I.O. Triple-negative Breast Cancer: Distinguishing between Basal and Nonbasal subtypes // *Clin. Cancer Res*. 2009. Vol. 15 (7). P. 2302–2310. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2132.
21. Reis-Filho J.S., Tutt A.N. Triple-negative tumors: a critical review // *Histopathology*. 2008. Vol. 52 (1). P. 108–118. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02889.x.
22. Reis-Filho J.S., Milanezi F., Savage K., Savage K., Simpson P.T., Nesland J.M., Pereira E.M., Lakhani S.R., Schmitt F.C. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumors // *Histopathology*. 2006. Vol. 49. P. 10–21. doi: 10.1111/j.1365-2559.2006.02467.x.
23. Rouzier R., Perou C.M., Symmans W.F., Ibrahim N., Cristofanilli M., Anderson K., Hess K.R., Stec J., Ayers M., Wagner P., Morandi P., Fan C., Rabiul I., Ross J.S., Hortobagyi G.N., Pusztai L. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy // *Clin. Cancer Res*. 2005. Vol. 11 (16). P. 5678–5685. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2421.
24. Smith I.E. Neoadjuvant/presurgical treatment // *Breast Cancer Res*. 2008. 10 (Suppl. 4). S. 24. doi: 10.1186/bcr2184.
25. Turner N., Tutt A., Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancer // *Nat. Rev. Cancer*. 2004. Vol. 4. P. 814–819.

Поступила 28.04.14

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЗАДЕРЖКИ СТАРТА СПЕЦИАЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ НЕОПЕРАБЕЛЬНЫМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО III СТАДИИ: РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Е.П. Соловьева^{1,2}, С.М. Асахин^{1,2}, М.Ю. Вальков^{1,2}

ГБУ АО «Архангельский клинический онкологический диспансер», г. Архангельск¹

ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет»

Минздравсоцразвития, г. Архангельск²

163000, г. Архангельск, Троицкий пр., 51, e-mail: solovyeva_ek@mail.ru;
m_valkov@mail.ru

Введение. До 30 % больных немелкоклеточным раком лёгкого (НМРЛ) имеют местнораспространённую опухоль, что является показанием для проведения консервативного лечения. Увеличение времени ожидания лучевой и/или химиотерапии может привести к прогрессированию опухоли и ухудшению показателей выживаемости.

Цель исследования. Оценить влияние продолжительности времени до старта терапии (ВСТ) на общую выживаемость (ОВ) больных с неоперабельным местнораспространённым НМРЛ.

Материал и методы. В ретроспективном исследовании 139 больных НМРЛ, получавших химиолучевое лечение, были разделены на подгруппы по длительности ВСТ. Оценку ОВ осуществляли методом Каплана–Мейера с определением различий между группами лог-ранговым методом, кумулятивную ОВ сравнивали с помощью метода χ^2 . Коррекцию ОВ с учётом влияния различных исходных факторов осуществляли с помощью регрессии Кокса.

Результаты. В течение 1 мес после установления диагноза ХЛТ была начата у 87 (63 %), через 31 день и более – у 52 (37 %) больных. Распределение по исходным факторам прогноза было равномерным, за исключением эксплоративной торакотомии, которая чаще была проведена в группе ВСТ>1 мес ($p=0,001$). Медиана ОВ при ВСТ≤1 месяца составила 14,2 мес (95 % ДИ 11,8–16,7), при ВСТ>1 мес – 19,1 мес (95 % ДИ 14,7–23,5), лог-ранговый тест $\chi^2=0,562$, $p=0,453$. Отношение рисков (ОР) смерти у больных с поздним началом специального лечения составило 0,87 (95 % ДИ 0,59–1,26), после коррекции по другим факторам – 0,86 (95 % ДИ 0,58–1,30).

Заключение. При ретроспективном анализе установлено, что время до начала химиолучевого лечения у больных с НМРЛ III стадии не оказывает влияния на прогноз выживаемости как при исходной химиотерапии, так и при лучевой терапии. Эти результаты требуют подтверждения в рандомизированном исследовании.

Ключевые слова: неоперабельный немелкоклеточный рак легкого III стадии, лучевая терапия, химиотерапия.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF THE DELAY IN STARTING SPECIAL TREATMENT FOR PATIENTS WITH SATGE III INOPERABLE NON-SMALL CELL LUNG CANCER: RESULTS OF STUDY AND LITERATURE REVIEW

E.P. Solovyeva^{1,2}, S.M. Asakhin^{1,2}, M.Yu. Valkov^{1,2}

Arkhangelsk Clinical Cancer Center, Arkhangelsk¹

Northern State Medical University, Arkhangelsk²

51, Troitskiy per., 163000-Arkhangelsk, Russia, e-mail: solovyeva_ek@mail.ru; m_valkov@mail.ru

Introduction. Up to 30 % of patients with non-small cell lung cancer have locally advanced tumor. Increased waiting time for radiation therapy and/or chemotherapy can result in tumor progression and impaired survival.

The purpose of the study was to evaluate the influence of the length of time before starting therapy on the overall survival in patients with inoperable locally advanced non-small cell lung cancer.

Materials and methods. In the retrospective study, 139 patients with non-small cell lung cancer, receiving chemoradiotherapy were divided into subgroups by the length of time before starting therapy. The overall survival was assessed using the Kaplan-Meier method

with determination of differences between groups by long-rank test, and the cumulative overall survival was compared using the χ^2 test. The Cox regression model was applied to evaluate the effect of covariates on overall survival.

Results. Chemoradiotherapy was started within 1 month after diagnosis in 87 (63 %) patients and in 31 days and later in 52 (37 %) patients. Distribution by initial prognostic factors was uniform, except for exploratory thoracotomy, which was performed more often in patients who received chemotherapy within 1 month after diagnosis ($p=0.001$). The median overall survival rate was 14.2 months (95 % CI: 11.8–16.7) for patients who received chemoradiotherapy within 1 month after diagnosis and 19.1 months (95 % CI: 14.7–23.5) for patients, who received therapy at least 1 months after diagnosis ($\chi^2=0.562$, $p=0.453$). Risk ratio (RR) of death was 0.87 (95 % CI: 0.59–1.26) in patients with late onset of special treatment.

Conclusion. The retrospective analysis showed that time before onset of chemoradiotherapy in patients with stage III non-small cell lung cancer had no influence on prognosis of survival, with the initial chemotherapy as well as radiotherapy. These results require confirmation in randomized trials.

Key words: inoperable stage III non-small cell lung cancer, radiation therapy, chemotherapy.

В структуре онкологической заболеваемости РФ рак лёгкого (РЛ) занимает первое место в течение последних 15 лет, на его долю приходится 22 % всех случаев рака у мужчин и 4 % – у женщин [1], ежегодно заболевает около 60 тыс. человек. Распространенность РЛ в России за последние 10 лет выросла с 76,2 в 2002 г. до 86,7 в 2012 г. на 100 тысяч населения (оба пола) [2]. Показатель летальности в течение первого года после установления диагноза при РЛ остается одним из самых высоких по сравнению с другими онкологическими заболеваниями: в 2012 г. он составил в РФ – 52 % [2], в Архангельской области – 56 % [3].

Особенно тяжёлым является прогноз при распространённых формах РЛ. При условно локализованной III стадии немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ) 5-летняя выживаемость не превышает 10 % [4]. Большинство больных НМРЛ являются неоперабельными при IIIA–B стадиях заболевания на момент постановки диагноза. Рекомендованным методом лечения при неоперабельных формах НМРЛ является сочетание лучевой (ЛТ) и химиотерапии (ХТ). Лечение может быть начато с ХТ или с ЛТ при последовательном варианте. Одновременная химиолучевая терапия, согласно данным рандомизированных исследований [6, 10], приводит к улучшению выживаемости ценой усиления токсичности и может быть рекомендована больным в хорошем исходном состоянии.

Диагностика, стадирование и определение тактики лечения неоперабельного НМРЛ порой занимают много времени [8]. При этом время ожидания начала лечения, по мнению некоторых исследователей, может быть важным фактором, определяющим прогноз у этих больных. Время удвоения плоскоклеточного рака легкого, оценен-

ное на биологической модели, определяет риск снижения локального контроля при ЛТ на 0,31 % ежедневно [19]. Более того, некоторые пациенты подвергаются риску стать неизлечимыми и во время ожидания терапии [13]. Таким образом, очевидно, что лечение РЛ необходимо начинать как можно раньше.

В ряде клинических исследований показано, что время до старта специального лечения (ВСТ) неоперабельного НМРЛ может сильно варьировать [16–21], при этом было обнаружено его негативное влияние на прогноз [9, 21, 22]. Однако в других исследованиях [13, 17, 20] такой взаимосвязи не выявлено. Важно учесть, что большинство исследований по оценке роли ВСТ при ЛТ/ХЛТ являлись одноцентровыми, включали гетерогенные когорты пациентов как с ранними, так и поздними стадиями РЛ, получавших ЛТ по разным методикам [9, 17, 18, 21, 22].

Цель исследования состоит в оценке влияния продолжительности времени до старта терапии на выживаемость когорты больных неоперабельным местнораспространённым немелкоклеточным раком лёгкого, получавших консервативное лечение в условиях ГБУЗ Архангельской области «Архангельский клинический онкологический диспансер» (АКОД).

Материал и методы

Ретроспективно прослежены данные о методах и исходах лечения больных неоперабельным местнораспространённым НМРЛ III стадии, получавших консервативное лечение в условиях АКОД. Для этого произведен отбор больных из госпитальной базы данных АКОД за период с 01.02.2000 по 12.02.2010 г. Подробная характеристика указанной когорты была опубликована ранее [5].

Согласно внутреннему протоколу АКОД, больным местнораспространенным неоперабельным РЛ в удовлетворительном состоянии изначально планируется химиолучевое лечение, как правило, последовательное. Ранее нами было показано, что при последовательной ХЛТ выбор первого метода (ЛТ либо ХТ) может оказать существенное влияние на прогноз [5]: выявлено статистически значимое преимущество в выживаемости у больных, исходно получавших ЛТ. В настоящем исследовании больные были разделены на группы по длительности ВСТ. В соответствии с рекомендациями [20, 23] ожидание начала консервативного лечения до 1 мес является приемлемым. Поэтому точкой разделения групп был выбран временной интервал 30 дней: ВСТ ≤ 30 дней и ВСТ > 30 дней.

Подробное описание методик ЛТ и ХТ было представлено ранее [5]. Дистанционную ЛТ планировали до радикальной суммарной дозы не менее 60 Гр. Тем не менее в окончательный анализ были также включены больные, получившие ЛТ в СОД 50–59 Гр. В облучаемый объем исходно включали первичную опухоль и регионарные лимфатические узлы. Лимфатические узлы корня легкого и средостения со стороны поражения облучали даже в отсутствие признаков их поражения, в таких случаях элективная доза составляла 40–44 Гр. В объем облучения не входили надключичные лимфатические узлы в случае отсутствия явных признаков метастатического поражения. Плановых перерывов в ЛТ не допускали.

Химиотерапию большинству больных, согласно локальному стандарту, принятому на основании международных рекомендаций, с 2005 г. проводили сочетанием препарат платины и этопозида (ЕР) в стандартных дозовых режимах. При лечении пациентов до 2005 г. применялись схемы, включавшие циклофосфан, доксорубин, этопозид, цисплатин. В исследование включали больных, прошедших не менее 2 курсов ХТ.

Основным критерием сравнительной оценки эффективности методов установили общую выживаемость (ОВ), измеренную как промежуток между датой начала специального лечения и смертью от любой причины. Время до старта терапии определяли как промежуток в днях между датами установления диагноза и начала любого специального лечения: ЛТ или ХТ.

Оценка распределения по непрерывным характеристикам проводилась с помощью критерия Стьюдента либо его непараметрического аналога Mann – Whitney (U-тест). Статистическую значимость различий в распределении по порядковым и качественным характеристикам определяли с помощью метода χ^2 с точным критерием Фишера при ожидаемом количестве наблюдений в сравниваемых группах менее 5. Все сравнения были двусторонними. Значения показателей кумулятивной выживаемости представляли в виде процентов с доверительными интервалами (ДИ). Выживаемость больных измеряли в месяцах и представляли в виде медианы (Me), 95% ДИ, ее оценка осуществлялась методом Каплана – Майера. Различия в выживаемости между группами определяли лонг-ранговым методом. Цензурирование проводили по дате последней проверки базы госпитального регистра либо по дате последней явки на контрольный осмотр для выбывших из-под наблюдения. Оценку степени влияния исходных факторов на выживаемость осуществляли с помощью регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса. Введение факторов, оказавших значимое влияние на прогноз в однофакторных моделях, в многофакторную регрессионную модель осуществляли форсированным методом.

Результаты исследования

Одновременную ХЛТ в анализируемый период времени применяли 3 пациентам, один из них по своим характеристикам соответствовал критериям отбора/невключения. Остальные больные получали последовательное консервативное лечение, начинавшееся с ХТ у 104, а с ЛТ – у 35. В итоге для анализа было отобрано 139 пациентов. Медиана ВСТ составила 23 дня (1–568 дней). У 4 больных (трое из них исходно получали ЛТ) ВСТ составила более 6 мес (185–568 дней). При анализе причин позднего начала специального лечения удовлетворительных объяснений этому не найдено: зарегистрированного в официальных медицинских документах специального противоопухолевого лечения эти больные в этот период не получали. Консервативное лечение было начато в течение 1 мес после установления диагноза 87 (63 %) пациентам, 52 (37 %) больным начато специальное лечение через 31 день и более. Распределение в подгруппах по исходным характе-

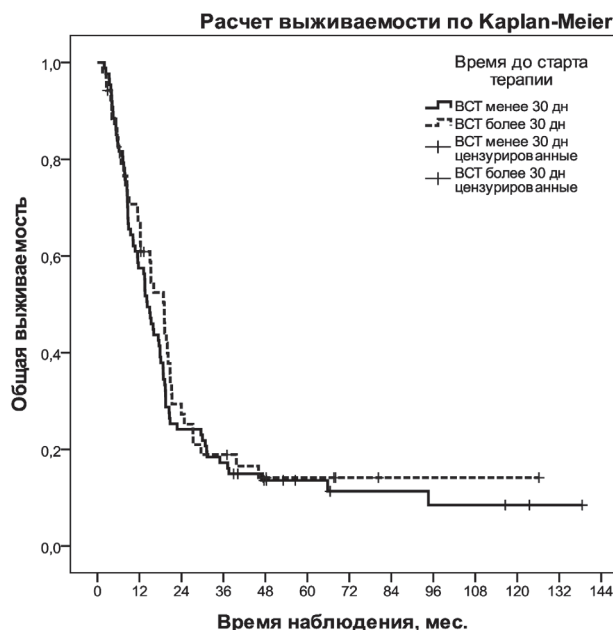


Рис. 1. Общая выживаемость в зависимости от времени старта терапии (ВСТ)

ристикам равномерное (табл. 1), за исключением проведенной эксплоративной торакотомии перед началом специальных методов лечения. Также несколько чаще ($p=0,079$) в группе ВСТ >30 встречались больные в состоянии ECOG 2.

Медиана общей выживаемости для всех больных составила 17,4 (95 % доверительный интервал (ДИ), 14,3–20,6) мес. Медиана ОВ при ВСТ ≤ 1 мес составила 14,2 мес (95 % ДИ, 11,8–16,7), при ВСТ >1 мес – 19,1 мес (95 % ДИ, 14,7–23,5), лог-ранговый тест $\chi^2=0,562$, $p=0,453$ (рис. 1).

Регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса для всей группы больных был проведен в связи с неравномерностью распределения больных по исходным параметрам (табл. 2). В модели множественной регрессии по Коксу относительный риск (ОР) смерти от любой причины у больных с поздним началом специального лечения составил 0,87 (95 % ДИ 0,59–1,26), после коррекции – 0,86 (95 % ДИ 0,58–1,30).

Обсуждение

В последние годы откладывание начала специальной терапии становится все более серьезной проблемой. Помимо психологического стресса у больных, ожидание и задержки могут повлиять на

результаты лечения и прогноз заболевания. Так, в ряде исследований обнаружена достоверная зависимость выживаемости больных немелкоклеточным раком лёгкого от объема опухоли [12, 25].

С биологической точки зрения длительное время до старта терапии может привести к увеличению размеров опухоли, росту регионарных и отдалённых метастазов, что будет иметь потенциальное негативное влияние на прогноз. Рак лёгкого долгое время остаётся потенциально излечимым и сначала растет медленно: до достижения опухолью 1 см в диаметре проходит около 130 мес [14]. В дальнейшем объем опухоли может экспоненциально увеличиваться, что приводит к переходу в неизлечимое состояние за 1 мес [21].

М. Hasegawa et al. [15] рассмотрели время удвоения объема опухоли (ВУО) при РЛ по данным серий скрининговых компьютерных томограмм. Обнаружено, что ВУО значительно различалось в зависимости от гистологического варианта: оно составило 533 ± 381 ; 129 ± 97 и 97 ± 46 дней для аденокарциномы, плоскоклеточного рака и мелкоклеточного рака соответственно. По другим данным, время удвоения для плоскоклеточного рака и аденокарциномы составляет 88 дней и 161 день соответственно [14, 25]. Таким образом, РЛ, который к моменту выявления едва определяется рентгенологически, возможно, возник несколько месяцев и даже лет назад.

При клинически определяемых опухолях темпы роста могут значительно увеличиваться. Так, в исследовании N. O'Rourke et al. [21] показано, что в период ожидания потенциально радикальной ЛТ, который длился от 35 до 187 дней, 6 из 29 (21 %) больных РЛ стали неизлечимыми. При этом опухоль увеличилась в размерах от 0 до 373 %. В исследовании El Sharouni et al. [11] доля ставших неизлечимыми пациентов была ещё выше: 9 из 22 (41 %) потенциально излечимых пациентов после исходной ХТ в дальнейшем лечились с паллиативной целью после периода ожидания от 29 до 141 дня. Первичная опухоль при сравнении диагностической (после ХТ) и планирующей (перед ЛТ) компьютерной томограмм увеличилась в размерах в 1,1–81,8 раза, медиана времени удвоения составила 29 дней.

В исследовании Wang Li et al. [24] по изучению ВСТ при III стадии НМРЛ медиана времени между датой первого диагностического снимка и снимка

перед началом ЛТ/ХЛТ составила для когорты из 237 пациентов 57 дней. В более раннем исследовании по оценке взаимосвязи между временем ожи-

дания и ростом опухоли [21] от первого посещения клиники до начала лечения пациента прошло от 35 до 187 дней, с медианой 94 дня. В ещё одном

Таблица 1

Распределение больных по исходным характеристикам

Характеристика	BCT≤30 (n=87)	BCT>30 (n=52)	p
Пол			0,650*
мужчины	83 (95,4 %)	51 (98,1 %)	
женщины	4 (4,6 %)	1 (1,9 %)	
Возраст, лет			0,438
до 50	6 (6,9 %)	8 (15,4 %)	
50–59	36 (41,4 %)	19 (36,5 %)	
60–69	34 (39,1 %)	18 (34,6 %)	
70 и старше	11 (12,6 %)	7 (13,5 %)	
Гистология			0,251
плоскоклеточный	59 (67,8 %)	40 (76,9 %)	
другой немелкоклеточный	28 (32,2 %)	12 (23,1 %)	
Статус по ECOG			0,079
ECOG 0–1	78 (89,7 %)	41 (78,8 %)	
ECOG 2	9 (10,3 %)	11 (21,2 %)	
Размер первичной опухоли			0,184
T ₁₋₂	33 (37,9 %)	14 (26,9 %)	
T ₃₋₄	54 (62,1 %)	38 (73,1 %)	
Поражение лимфоузлов			0,887
N ₀₋₁	21 (24,1 %)	12 (23,1 %)	
N ₂₋₃	66 (75,9 %)	40 (76,9 %)	
Подстадия			0,495
A	42 (48,3 %)	22 (42,3 %)	
B	45 (51,7 %)	30 (57,7 %)	
Эксплоративная торакотомия			0,001
нет	80 (92,0 %)	37 (71,2 %)	
да	7 (8,0 %)	15 (28,8 %)	
ХЛТ начата с...			0,398
ХТ	24 (27,6 %)	11 (21,2 %)	
ЛТ	63 (72,4 %)	41 (78,8 %)	

Примечание: * – точный тест Фишера.

одноцентровом исследовании из Великобритании [7] оценили среднее время от направления к специалисту до начала лечения в 48 дней. Шведские исследователи [17] проанализировали данные о 134 пациентах с НМРЛ I–IV стадий и показали, что среднее время от первого визита к специалисту до установления диагноза составило 9 дней, а от постановки диагноза до начала лечения – 79 дней. Среди 466 шведских пациентов с НМРЛ I–IV стадий G. Myrdal et al. [20] определили медиану времени от первого визита к специалисту до начала лечения около 48 дней. В нашем исследовании медиана времени до старта терапии составила 23 дня (табл. 3).

В нашем исследовании установлено, что длительная задержка до начала лечения больных раком лёгкого III стадии не вызвала снижения их выживаемости. Вероятно, причина этого в том, что пациенты с более агрессивным фенотипом опухоли и быстро прогрессирующими симптомами заболевания быстрее получают лечение. Наоборот, как правило, пациенты с медленно растущими бессимптомными опухолями менее охотно и быстро

проходят обследование и соглашаются на лечение. При этом скорость роста опухоли, как было показано во многих исследованиях [11, 21], является одним из основных факторов прогноза. Ретроспективный характер исследования и невозможность клинического измерения скорости роста опухоли не позволяют определить возможную причину отсутствия взаимосвязи между временем ожидания и выживаемостью.

Заключение

Наши результаты показывают, что время до начала химиолучевого лечения больных неоперабельным немелкоклеточным раком легкого III стадии не оказывает влияния на прогноз выживаемости как при исходной химиотерапии, так и лучевой терапии. Ретроспективный характер работы не исключает возможности селекции в группы раннего старта терапии больных с более агрессивно текущими процессами. Для определения влияния задержки начала лечения на прогноз необходимо проспективное планирование исследования с привлечением методов (лучше биологических) оценки исходной скорости роста опухоли.

Таблица 2

Результаты однофакторного и многофакторного анализа выживаемости в зависимости от ВСТ

Характеристика	Нескорректированная			Скорректированная *		
	ОР	95 % ДИ	p	ОР	95 % ДИ	p
ВСТ менее 30 дней	1,00	Референтная		1,00	Референтная	
ВСТ более 30 дней	0,87	0,59 – 1,26	0,45	0,86	0,58 – 1,30	0,48

Примечание: * – после коррекции по полу, возрасту, исходному состоянию по ECOG, подстадии, распространённости по T и N, последовательности методов лечения, пробной торакотомии.

Таблица 3

Время до старта терапии при раке легкого по данным литературы

Автор (год)	Кол-во пациентов в исследовании	Медиана времени до старта терапии
Wang Li et al. (2009) [24]	237	57
N. O'Rourke et al. (2000) [21]	29	94
H. Bozcuk et al. (2001) [7]	198	48
H. Koyi et al. (2002) [17]	134	79
G. Myrdal (2004) [20]	466	48
Е.П. Соловьева и др. (2013) [5]	139	23

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ в 2007 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2009. № 20 (3s). С. 52–90.
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2012 году. М., 2013. С. 20–95.
3. Красильников А.В., Потехина Е.Ф. Состояние онкологической помощи населению Архангельской области в 2012 году // Оптимизация лечебно-диагностической тактики при онкологических заболеваниях: Материалы научно-практической конференции. Архангельск, 2013. С. 8–58.
4. Онкология. Справочник практического врача / Под ред. И.В. Поддубной. М.: МЕДпресс-информ, 2009. 768 с.
5. Соловьева Е.П., Кононова Г.В., Вальков М.Ю. Выбор очередности методов консервативного лечения неоперабельного немелкоклеточного рака легкого III стадии: ретроспективный анализ выживаемости // Вестник РНЦПР. 2012. № 12. http://www.vestnik.mccr.ru/vestnik/v12/papers/solo_v12.htm
6. Aupérin A., Le Péchoux C., Rolland E., Curran W., Furuse K., Fournel P., Belderbos J., Clamon G., Ulutin H.C., Paulus R., Yamanaka T., Bozonnat M.C., Uitterhoeve A., Wang X., Stewart L., Arriagada R., Burdett S., Pignon J.P. Meta-Analysis of Concomitant Versus Sequential Radiochemotherapy in Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. // J. Clin. Oncol. 2010. Vol. 28. P. 2181–2190. doi: 10.1200/JCO.2009.26.2543.
7. Bozcuk H., Martin C. Does treatment delay affect survival in non-small cell lung cancer? A retrospective analysis from a single UK centre // Lung Cancer. 2001. Vol. 34. P. 243–252.
8. Butof R., Baumann M. Time in radiation oncology – keep it short! // J. Radiother. Oncol. 2013. Vol. 106 (3). P. 271–275. doi: 10.1016/j.radonc.2013.03.007.
9. Christensen E.D., Harvald T., Jendresen M., Aggestrup S., Petterson G. The impact of delayed diagnosis of lung cancer on the stage at the time of operation // Eur. J. Cardiothorac. Surg. 1997. Vol. 12. P. 880–884.
10. De Ruysscher D., Botterweck A., Dirx M., Pijls-Johannesma M., Wanders R., Hochstenbag M., Dingemans A.M., Bootsma G., Geraedts W., Simons J., Pitz C., Lambin P. Eligibility for concurrent chemotherapy and radiotherapy of locally advanced lung cancer patients: a prospective, population-based study // Ann. Oncol. 2009. Vol. 20. Issue 1. P. 98–102. doi: 10.1093/annonc/mdn559.
11. El Sharouni S.Y., Kal H.B., Battermann J.J. Accelerated regrowth of non-small-cell lung tumours after induction chemotherapy // Br. J. Cancer. 2003. Vol. 89. P. 2184–2189.
12. Etiz D., Marks L.B., Zhou S.M., Bentel G.C., Clough R., Hernando M.L., Lind P.A. Influence of tumor volume on survival in patients irradiated for non-small-cell lung cancer // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2002. Vol. 53. P. 835–846.
13. Falk S.J., Girling D.J., White R.J., Hopwood P., Harvey A., Qian W., Stephens R.J. Immediate versus delayed palliative thoracic radiotherapy in patients with unresectable locally advanced non-small cell lung cancer and minimal thoracic symptoms: randomised controlled trial // BMJ. 2002. Vol. 325. P. 465.
14. Geddes D.M. The natural history of lung cancer: a review based on rates of tumour growth // Br. J. Dis. Chest. 1979. Vol. 73. P. 1–17.
15. Hasegawa M., Sone S., Takashima S., Li F., Yang Z.G., Maruyama Y., Watanabe T. Growth rate of small lung cancers detected on mass CT screening // Br. J. Radiol. 2000. Vol. 73. P. 1252–1259.
16. Jensen A.R., Mainz J., Overgaard J. Impact of delay on diagnosis and treatment of primary lung cancer // Acta Oncol. 2002. Vol. 41. P. 147–152.
17. Koyi H., Hillerdal G., Branden E. Patient's and doctors' delays in the diagnosis of chest tumors // Lung Cancer. 2002. Vol. 35. P. 53–57.
18. Liberman M., Liberman D., Sampalis J.S., Milder D.S. Delays to surgery in non-small-cell lung cancer // Can. J. Surg. 2006. Vol. 49. P. 31–36.
19. Mackillop W.J., Bates J.H., O'Sullivan B., Withers H.R. The effect of delay in treatment on local control by radiotherapy // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1996. Vol. 34. P. 243–250.
20. Myrdal G., Lambe M., Hillerdal G., Lamberg K., Agustsson Th., Stahl E. Effect of delays on prognosis in patients with non-small cell lung cancer // Thorax. 2004. Vol. 59. P. 45–49.
21. O'Rourke N., Edwards R. Lung cancer treatment waiting times and tumour growth // Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.). 2000. Vol. 12. P. 141–144.
22. Robinson E., Mohilever J., Zidan J., Sapir D. Delay in diagnosis of cancer. Possible effects on the stage of disease and survival // Cancer. 1984. Vol. 54. P. 1454–1460.
23. The diagnosis and treatment of lung cancer (update): full guideline (January 2011) 227 p. Available at: <http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/11885/53195/53195.pdf>.
24. Wang Li, Correa C.R., Hayman A.J., Zhao L., Cease K., Brenner D., Arenberg D., Curtis J., Kalemkerian G.P., Kong F.M. Time to Treatment in Patients with Stage III Non-Small Cell Lung Cancer // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2009. Vol. 74. P. 790–795. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.08.039.
25. Willner J., Baier K., Caragiani E., Tschammler A., Flentje M. Dose, volume, and tumor control prediction in primary radiotherapy of non-small-cell lung cancer // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2002. Vol. 52. P. 382–389.

Поступила 24.04.14

REFERENCES

1. Davydov M.I., Aksel' E.M. Incidence of malignant diseases in Russia and countries of Commonwealth Non-Aligned States 2007. // Vestnik RNC im. N.N. Blohina RAMN. 2009. 20 (3s). P. 52–90. [in Russian]
2. Kaprin A.D., Starinskij V.V., Petrova G.V. Oncological service for Russian population in 2012. // M., 2013. P. 20–95. [in Russian]
3. Krasil'nikov A.V., Potehina E.F. Oncological service for population of Arhangel'skaya oblast in 2012. // Optimizaciya lechebno-diagnosticheskoy taktiki pri onkologicheskikh zabolevaniyakh: materialy nauchno-prakticheskoy konferencii. Arhangel'sk, 2013. P. 8–58. [in Russian]
4. Oncology: manual of practicing doctor / Ed. I.V. Poddubnaya. M.: MEDpress-inform, 2009. 768 p. [in Russian]
5. Solov'eva E.P., Kononova G.V., Val'kov M.Ju. Choice of method sequence for conservative treatment for Stage III inoperable non-small cell lung cancer: retrospective survival analysis // Vestnik RNCRR. 2012. № 12. [in Russian] Available at: http://www.vestnik.mccr.ru/vestnik/v12/papers/solo_v12.htm.
6. Aupérin A., Le Péchoux C., Rolland E., Curran W., Furuse K., Fournel P., Belderbos J., Clamon G., Ulutin H.C., Paulus R., Yamanaka T., Bozonnat M.C., Uitterhoeve A., Wang X., Stewart L., Arriagada R., Burdett S., Pignon J.P. Meta-Analysis of Concomitant Versus Sequential Radiochemotherapy in Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. // J. Clin. Oncol. 2010. Vol. 28. P. 2181–2190. doi: 10.1200/JCO.2009.26.2543.
7. Bozcuk H., Martin C. Does treatment delay affect survival in non-small cell lung cancer? A retrospective analysis from a single UK centre // Lung Cancer. 2001. Vol. 34. P. 243–252.
8. Butof R., Baumann M. Time in radiation oncology – keep it short! // J. Radiother. Oncol. 2013. Vol. 106 (3). P. 271–275. doi: 10.1016/j.radonc.2013.03.007.
9. Christensen E.D., Harvald T., Jendresen M., Aggestrup S., Petterson G. The impact of delayed diagnosis of lung cancer on the stage at the time of operation // Eur. J. Cardiothorac. Surg. 1997. Vol. 12. P. 880–884.
10. De Ruysscher D., Botterweck A., Dirx M., Pijls-Johannesma M., Wanders R., Hochstenbag M., Dingemans A.M., Bootsma G., Geraedts W., Simons J., Pitz C., Lambin P. Eligibility for concurrent chemotherapy and radiotherapy of locally advanced lung cancer patients: a prospective, population-based study // Ann. Oncol. 2009. Vol. 20. Issue 1. P. 98–102. doi: 10.1093/annonc/mdn559.
11. El Sharouni S.Y., Kal H.B., Battermann J.J. Accelerated regrowth of non-small-cell lung tumours after induction chemotherapy // Br. J. Cancer. 2003. Vol. 89. P. 2184–2189.
12. Etiz D., Marks L.B., Zhou S.M., Bentel G.C., Clough R., Hernando M.L., Lind P.A. Influence of tumor volume on survival in patients irradiated for non-small-cell lung cancer // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2002. Vol. 53. P. 835–846.

13. Falk S.J., Girling D.J., White R.J., Hopwood P., Harvey A., Qian W., Stephens R.J. Immediate versus delayed palliative thoracic radiotherapy in patients with unresectable locally advanced non-small cell lung cancer and minimal thoracic symptoms: randomised controlled trial // *BMJ*. 2002. Vol. 325. P. 465.
14. Geddes D.M. The natural history of lung cancer: a review based on rates of tumour growth // *Br. J. Dis. Chest*. 1979. Vol. 73. P. 1–17.
15. Hasegawa M., Sone S., Takashima S., Li F., Yang Z.G., Maruyama Y., Watanabe T. Growth rate of small lung cancers detected on mass CT screening // *Br. J. Radiol*. 2000. Vol. 73. P. 1252–1259.
16. Jensen A.R., Mainz J., Overgaard J. Impact of delay on diagnosis and treatment of primary lung cancer // *Acta Oncol*. 2002. Vol. 41. P. 147–152.
17. Koyi H., Hillerdal G., Branden E. Patient's and doctors' delays in the diagnosis of chest tumors // *Lung Cancer*. 2002. Vol. 35. P. 53–57.
18. Liberman M., Liberman D., Sampalis J.S., Milder D.S. Delays to surgery in non-small-cell lung cancer // *Can. J. Surg*. 2006. Vol. 49. P. 31–36.
19. Mackillop W.J., Bates J.H., O'Sullivan B., Withers H.R. The effect of delay in treatment on local control by radiotherapy // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 1996. Vol. 34. P. 243–250.
20. Myrdal G., Lambe M., Hillerdal G., Lamberg K., Agustsson Th., Stahle E. Effect of delays on prognosis in patients with non-small cell lung cancer // *Thorax*. 2004. Vol. 59. P. 45–49.
21. O'Rourke N., Edwards R. Lung cancer treatment waiting times and tumour growth // *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*. 2000. Vol. 12. P. 141–144.
22. Robinson E., Mohilever J., Zidan J., Sapir D. Delay in diagnosis of cancer. Possible effects on the stage of disease and survival // *Cancer*. 1984. Vol. 54. P. 1454–1460.
23. *The diagnosis and treatment of lung cancer (update): full guideline* (January 2011) 227 p. Available at: <http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/11885/53195/53195.pdf>.
24. Wang Li, Correa C.R., Hayman A.J., Zhao L., Cease K., Brenner D., Arenberg D., Curtis J., Kalemkerian G.P., Kong F.M. Time to Treatment in Patients with Stage III Non-Small Cell Lung Cancer // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2009. Vol. 74. P. 790–795. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.08.039.
25. Willner J., Baier K., Caragiani E., Tschammler A., Flentje M. Dose, volume, and tumor control prediction in primary radiotherapy of non-small-cell lung cancer // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2002. Vol. 52. P. 382–389.

УДК: 618.19-006.6:615.28:575.224.23

МИКРОМАТРИЧНЫЙ АНАЛИЗ АНОМАЛИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СВЯЗЬ С ЭФФЕКТОМ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

**Н.В. Литвяков^{1,2}, М.М. Цыганов^{1,2}, Н.В. Чердынцева^{1,2,3}, Е.М. Слонимская^{1,3},
П.В. Иваньковская¹, М.К. Ибрагимова¹, Е.Ю. Гарбуков¹, С.А. Коростелев⁴,
О.Ю. Потапова⁵, Е.Л. Чойнзонов^{1,3}**

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск²

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения РФ, г. Томск³

ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»

Министерства здравоохранения РФ, г. Москва⁴

Cureline East Research Inc, USA⁵

634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: nvlitv72@yandex.ru¹

Представлены новые данные об аномалиях числа копий ДНК (Copy Number Aberration – CNA) в опухолях молочной железы и их связи с эффективностью неоадьювантной химиотерапии.

Методы. В исследование включены 68 больных раком молочной железы (РМЖ), получавшие 2–4 курса неоадьювантной химиотерапии (НАХТ). Исследование несбалансированных хромосомных перестроек – числовых и структурных CNA – проводили в биопсийных образцах опухолевой ткани, полученных до лечения, с использованием микроматрицы высокой плотности CytoScan™ HD Array (Affymetrix, USA). Непосредственную эффективность НАХТ оценивали по критериям ВОЗ.

Результаты. Амплификация 1q43 связана с хорошим ответом на НАХТ. У 83 % (33/39) больных с амплификацией 1q43 наблюдается частичная регрессия опухоли, тогда как у 78 % (18/23) больных с нормальным состоянием 1q43 хромосомного региона ответ на терапию отсутствует ($p=0,00085$ по критерию Фишера с поправкой Бонферрони). У 83 % (25/30) больных с делецией 11q22.1-23.3 отмечается ответ на НАХТ, а 68 % (23/34) больных с нормальным состоянием региона не отвечали на лечение ($p=0,000047$). Сочетание «амплификационных» и «делеционных» маркеров увеличивает чувствительность и специфичность прогнозирования ожидаемой эффективности НАХТ. Если наблюдаются амплификация в 1q43 и/или делеция 18p11.21 локусах, то у 92 % больных (35/38) отмечается частичная регрессия, при нормальном состоянии этих локусов у 81 % больных (21/26) отсутствует ответ на НАХТ ($p=0,000002$).

Заключение. Наличие несбалансированных хромосомных перестроек в регионах 1q, 11q и 18p ДНК опухоли молочной железы до лечения коррелирует с выраженным эффектом химиотерапии и может быть использовано в качестве маркера для прогнозирования ожидаемой эффективности НАХТ с высоким уровнем достоверной вероятности.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроматричный анализ, хромосомные аномалии, факторы прогноза, неоадьювантная химиотерапия.

MICROARRAY ANALYSIS OF DNA COPY NUMBER ABERRATION IN BREAST TUMOR: CORRELATION WITH THE EFFICACY OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

N.V. Litviakov^{1,2}, M.M. Tsyganov^{1,2}, N.V. Cherdyntseva^{1,2,3}, E.M. Slonimskaya^{1,3}, P.V. Ivankovskaya¹, M.K. Ibragimova^{1,5}, E.Yu. Garbukov¹, S.A. Korostelev⁴, O.Yu. Potapova⁵, E.L. Choinzonov^{1,3}

Cancer Research Institute, Siberian Branch of the RA MS, Tomsk¹

National Research Tomsk State University, Tomsk²

Siberian State Medical University, Tomsk³

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow⁴

Cureline East Research Inc, USA⁵

5, Kooperativnyi Street, 634050-Tomsk, Russia, e-mail: nvlitv72@yandex.ru¹

This study presents the new evidences for DNA Copy Number Aberration (CNA) within breast tumors and its association with the efficacy of preoperative (neoadjuvant) chemotherapy.

Methods. 68 breast cancer patients were treated with 2–4 courses of neoadjuvant chemotherapy. Unbalanced chromosome abnormalities – numeric and structural CNA in biopsy specimens were tested using high-density microarray platform CytoScan™ HD Array (Affymetrix, USA). Immediate tumor response to NAC was measured in accordance with recommendations of WHO.

Results. 1q43 amplification correlated with good response to NAC. Partial tumor regression was observed in 83 % (33/39) of patients with 1q43 amplification, whereas no response to NAC was found in 78 % (18/23) of patients with normal 1q43 region ($p=0.00085$ Fisher test, Bonferroni correction). Among patients with chromosomal deletions at 11q22.1-23.3, 83 % (25/30) manifested the response to NAC, whereas 68 % (23/34) deletion-free persons did not respond to therapy. Combination of amplification and deletion markers increased the sensitivity and specificity for predicting response to NAC. Amplification in 1q43 along with deletion in 18p11.21 loci resulted in partial tumor regression in 92 % (35/38) of patients. In the case of the normal status of these loci, 81 % (21/26) of patients had no response to NAC ($p=0.000002$).

Conclusion. The presence of unbalanced, chromosome abnormalities in 1q, 11q and 18p loci within breast tumors before treatment correlates with good response to NAC and can be used as a marker for predicting response to neoadjuvant chemotherapy with high confidence interval.

Key words: breast cancer, microarray analysis, chromosomal abnormalities, prognostic factors, neoadjuvant chemotherapy.

Делеции или амплификации хромосомных регионов и отдельных хромосом называют абберациями числа копий ДНК (CNA – copy number aberration). Эти типы цитогенетических нарушений могут влиять на экспрессию генов, локализованных в абберантных регионах. Делеции приводят к снижению экспрессии генов, а амплификации – к повышению [14, 21]. CNA особенно распространены в солидных опухолях различных локализаций и, в частности, в опухоли молочной железы (www.progenetix.org [7, 13]).

В опухолях молочной железы наиболее часто CNA наблюдается в регионах 1q, 8q и 16q. Амплификации отмечаются в 1q, 8p12, 8q24.21, 17q12, 11q13.3 и 11q13.5, в которых локализованы такие известные онкогены, как *HER2*, *c-Myc*, *CCND1* и *PAK1*, делеции – 8p, 11q, 16q и 17p хромосомных локусов [15]. Есть сведения о связи CNA опухолевой ДНК с молекулярными подтипами рака молочной железы (РМЖ) и экспрессионными характеристиками опухоли [4, 12, 13, 19]. Например, амплификации 1q21-43 и 16p12 хромосомных

регионов и делеция 16q21-24 связаны с наличием на клетках опухоли рецепторов к эстрогену, а делеции 4p13-16 и 5q11.2-31 сайтов ассоциированы с отсутствием рецепторов к прогестерону [9].

Большой интерес представляют работы, посвященные поиску специфических CNA паттернов, характеризующих высокий риск метастазирования РМЖ. В частности, установлено, что амплификации 8q22.3 и 11q14.1 регионов связаны с более низкими показателями безметастатической и общей выживаемости пациентов [8, 22]. Наличие делеции длинного плеча 11q хромосомы является неблагоприятным прогностическим фактором у больных с трижды негативным молекулярным подтипом рака молочной железы (клетки опухоли не имеют рецепторов к эстрогенам, прогестерону и эпидермальному фактору роста HER2), которые не получали послеоперационную химиотерапию [9]. В исследовании Н. Wikman et al. (2012) установлена область 11p15, делеция которой ассоциирована с высокой частотой метастазирования в головной мозг [20].

Комбинированное лечение больных РМЖ включает неоадьювантную химиотерапию (НАХТ), которая направлена на уменьшение объема опухоли до резектабельных размеров или создает условия для проведения органосохранных операций. Однако регрессия опухоли при НАХТ наблюдается далеко не у всех больных, при этом не существует стандартных критериев прогноза непосредственного эффекта химиотерапии [2, 16]. Исследований, касающихся связи CNA с эффективностью НАХТ при РМЖ, немного. В работе корейских ученых на 15 образцах опухоли больных РМЖ, у которых не наблюдалось эффекта от НАХТ таксанами, установлены амплификации в 8q (24.3, 24.22, 22.1-3), 13q21.1 и 20q (13.2-13.33) регионах и делеции 8p23.3-1 и 17p13.3 сайтов [11]. Показано, что повышенный уровень CNA определяет неэффективность терапии таксанами и усиливает чувствительность к препаратам платины [17]. Учитывая немногочисленность и разрозненность клинических исследований, посвященных ассоциации CNA с эффективностью неоадьювантной химиотерапии, особенно в полногеномном масштабе, и важность самого этапа НАХТ в лечении больных РМЖ [10], представлялось актуальным проведение микрочипового исследования аберраций числа копий ДНК в опухоли молочной железы и оценка их ассоциации с эффектом неоадьювантной химиотерапии.

Материал и методы

В исследование включены 68 больных РМЖ ПА–IIIС стадии, с морфологически верифицированным диагнозом, в возрасте 28–68 лет, в среднем – $53,43 \pm 0,78$ года (таблица). В соответствии с «Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania» [18] все больные получали 2–4 курса неоадьювантной химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубин, кселода) или монотерапию таксотером. Через 3–5 нед после НАХТ проводилась операция, затем больным проводили 2 курса адьювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.), получено разрешение локального этического комитета ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН. Были использованы биопсийные опухолевые образцы

(~10 мм³), взятые до лечения под контролем УЗИ. Образцы опухоли замораживали в жидком азоте и сохраняли при температуре –80°C для выделения ДНК.

Эффективность предоперационной химиотерапии оценивали по критериям ВОЗ с помощью УЗИ и маммографии. Из исследования были исключены образцы больных, у которых была полная морфологическая регрессия опухоли, в связи с малочисленностью этой группы. Согласно международным рекомендациям, при проведении предоперационной химиотерапии больные РМЖ со стабилизацией или прогрессированием составляют группу с отсутствием ответа на НАХТ, а больные с частичной регрессией – группу с объективным клиническим ответом [16].

До лечения ДНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию ДНК и чистоту выделения оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) (от 50 до 150 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 2.10–2.35$; $A_{260}/A_{230} = 2.15–2.40$). Целостность ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA), фрагменты ДНК имели массу более 48 kbp.

Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array, (<http://www.affymetrix.com/eseach/search.jsp?pd=prod520004&N=4294967292>), которые содержат 2 млн 670 тыс. маркеров – 1 млн 900 тыс. непалиморфных маркеров и более 750 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), позволяющих определить структурные вариации более чем 36 тысяч генов. Наличие полиморфных маркеров на микроматрице позволяет также определить участки с потерей гетерозиготности. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA).

Для обработки результатов микрочипирования использовали программу «Chromosome Analysis Suite 2.0» (Affymetrix, USA), которая разработана специально для анализа результатов микрочипирования на матрице CytoScan™ HD Array. В хромосомах определяли несбалансированные хро-

Таблица

Клинико-патологические параметры обследованных больных РМЖ

Клинико-патологический параметр		Число больных
Возраст (лет)	≤45	21 (30,9 %)
	>45	47 (69,1 %)
Менструальный статус	Пременопауза	36 (52,9 %)
	Постменопауза	32 (47,1 %)
Гистологический тип	Инвазивный протоковый рак	58 (85,3 %)
	Инвазивный дольковый рак	3 (4,4 %)
	Медулярный рак	2 (2,9 %)
	Другие типы	5 (7,4 %)
Размер опухоли	T ₁	9 (13,2 %)
	T ₂	52 (76,5 %)
	T ₃	3 (4,4 %)
	T ₄	4 (5,9 %)
Лимфогенное метастазирование	N ₀	27 (39,7 %)
	N ₁	31 (45,6 %)
	N ₂	4 (5,9 %)
	N ₃	6 (8,8 %)
Рецепторы эстрогена	+	33 (48,5 %)
	–	31 (42,6 %)
	Нет данных	4 (5,9 %)
Рецепторы прогестерона	+	35 (51,5 %)
	–	29 (42,26 %)
	Нет данных	4 (5,9 %)
Рецепторы эпидермального фактора роста HER2	0/+	47 (69,1 %)
	++	10 (14,7 %)
	+++	6 (8,8 %)
	Нет данных	5 (7,4 %)
Молекулярный подтип	Люминальный В	40 (59,7 %)
	Трижды негативный	17 (25,4 %)
	HER2-позитивный	10 (14,9 %)
Гистологическая форма	Уницентрическая	45 (66,2 %)
	Мультицентрическая	23 (33,8 %)
Степень лекарственного патоморфоза	1 степень	21 (30,9 %)
	2 степень	22 (32,4 %)
	3 степень	6 (8,8 %)
	Нет данных	19 (27,9 %)
Степень злокачественности	1 степень	2 (2,9 %)
	2 степень	48 (70,6 %)
	3 степень	6 (8,8 %)
	Нет данных	12 (17,6 %)
Схема НАХТ	СAX	21 (30,9 %)
	FAC	33 (48,5 %)
	Тасотер	14 (20,6 %)
Ответ на НАХТ	Объективный клинический ответ	40 (58,8 %)
	Отсутствие ответа	28 (41,2 %)

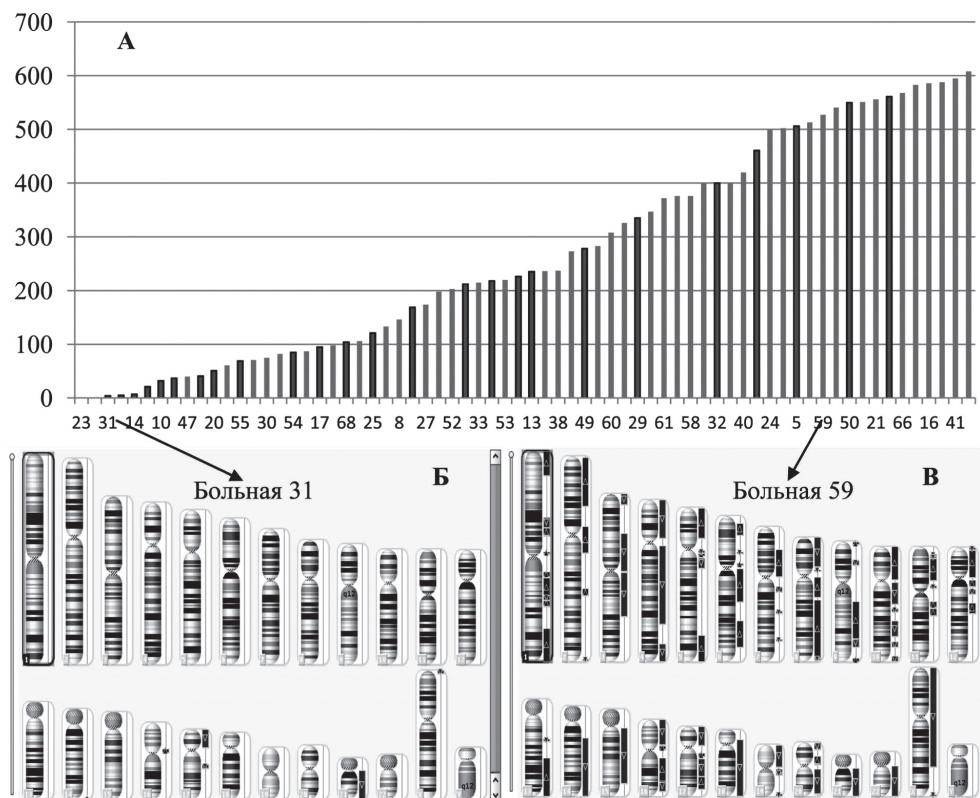


Рис. 1. Амплификации и делеции в ДНК опухолевой ткани больных РМЖ:

а) количество цитобэндов с CNA (делеции + амплификации) индивидуально у каждой больной раком молочной железы до лечения;

б) у больной 31 (слева) в опухолевой ткани практически отсутствуют CNA; в) у больной 59 CNA присутствуют в каждой хромосоме.

Примечание: на рис. 1а по оси абсцисс – номера больных, по оси ординат – количество цитобэндов с CNA, темные столбики – отсутствие ответа на НАХТ (стабилизация или прогрессирование); на рис 1б и 1в представлены окна программы «Chromosome Analysis Suite 2.0», участки амплификации выделены синим, участки делеций – красным

мосомные aberrации – делеции и амплификации (Loss и Gain). Поскольку в образцах опухолевой ткани обязательно присутствуют стромальные элементы и другие нормальные клетки, в полученной ДНК высок процент нормальной геномной ДНК. Микрочип CytoScan™ HD Array позволяет выявлять 5 % и более мутантной ДНК. Практически во всех случаях CNA были мозаичными, т.е. мутантная опухолевая ДНК определялась на фоне нормальной ДНК. Процент мутантной ДНК – статус числа копий (CN-state) – колебался от 15 до 88 %. В программе «Chromosome Analysis Suite 2.0» мозаицизм графически представляется аллельными пиками (Allele Peaks) с 4 «полосками» (AAA, AAB, ABB, BBB). Показатель snpQC колебался от 9 до 25 и отрицательно коррелировал с частотой CNA. Даже при низких значениях snpQC ширина Allele

Peaks была «хорошей» (по классификации базы progenetix [7]) для идентификации CNA.

При помощи программы «Chromosome Analysis Suite 2.0» оценивали наличие структурных CNA во всех 852 цитобэндах всех хромосом. Статистическую значимость связи частоты цитобэндов с CNA и эффекта НАХТ анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера. Отношение шансов – OR, относительный риск – RR и уровень значимости p по двухстороннему критерию Фишера вычисляли при помощи калькулятора <http://vassarstats.net/odds2x2.html>. Для поправки на множественные сравнения использовали поправку Бонферрони.

Результаты исследования

Количество цитобэндов с CNA в опухолях разных пациентов колеблется в очень широких пределах: от 1 до 608, что составляет от 0,1 %

до 75 % от общего числа цитобэндов (рис. 1а), т.е. можно говорить о континууме частоты CNA. Встречаются пациенты, у которых в опухоли могут присутствовать протяженные делеции или амплификации в каждой хромосоме, в то время как у других они практически отсутствуют (рис. 1в и 1б соответственно).

Средняя частота выявленных амплификаций была почти в 2 раза ниже, чем частота делеций (92 против 170, $p=0,0002$), у 70,6 % (48/68) больных амплификации встречались реже, чем делеции. В группе больных, у которых амплификаций было больше, чем делеций, общая частота CNA в цитобэндах в 3 раза меньше, чем у больных, у которых делеции встречались чаще, чем амплификации (100 против 334, $p=0,000001$).

Количество цитобэндов с CNA связано с эффективностью НАХТ. В группе больных РМЖ с числом цитобэндов с CNA менее 60 (11/68 – 16 %) у 82 % (9/11) отмечается отсутствие ответа на НАХТ (стабилизация или прогрессирование). У 41 % (28/68) пациентов отмечается высокий уровень CNA, и частота цитобэндов с делециями или амплификациями составляет более 300. Отвечают на НАХТ 75% (21/28) этих больных. Можно полагать, что существенный дисбаланс клеточных сигналов в опухоли, связанный с большим количеством CNA и развитием генетической нестабильности, способствует более выраженному цитотоксическому действию конвенциональных химиопрепаратов, используемых при лечении. Прежде всего, это касается лекарственных средств, действующих на молекулу ДНК (циклофосфан, фторурацил, кселода, препараты платины). Это подтверждают S.E. McClelland et al. (2009), которые показали связь повышенного уровня CNA с резистентностью к таксанам и чувствительностью к препаратам платины [17]. Весьма вероятно, что оценка числа цитобэндов с CNA будет полезной при выборе химиопрепаратов для предоперационной терапии больных РМЖ.

На следующем этапе проанализирована связь изменений всех 852 цитобэндов с эффективностью НАХТ. На рис. 2 представлены частоты CNA в опухоли больных с частичной регрессией (рис. 2а) и отсутствием ответа на НАХТ (рис. 2б). Отдельно вычислена разница в частоте амплификаций или делеций (рис. 2в) между опухолями пациентов (ответивших и не ответивших на НАХТ). Наи-

большая разница по амплификациям (40–60 %) наблюдалась в длинном плече 1 хромосомы (максимальная – для цитобэнда 1q43). Амплификация длинного плеча 1 хромосомы (1q23.2-1q43) ассоциирована с хорошим ответом на НАХТ. У 76–83 % больных с амплификацией длинного плеча 1 хромосомы наблюдается частичная регрессия, тогда как у 60–78 % больных с нормальным состоянием 1q23.2-1q43 хромосомного региона отмечается отсутствие ответа на НАХТ. Анализ с использованием критерия Фишера показал, что наличие/отсутствие амплификации в 1q43 цитобэнде можно использовать в качестве маркера ожидаемой эффективности НАХТ рака молочной железы с отношением шансов $OR=19,8$ (5,29–74,01), относительным риском $RR=5,09$ (2,36–10,95) ($p=0,000001$ по критерию Фишера или $p=0,00085$ с поправкой Бонферрони на множественные сравнения), чувствительностью – 83 % (33/39) и специфичностью – 78 % (18/23) (все вычисления произведены для цитобэнда 1q43).

Наибольшая разница по частоте встречаемости делеций (30–40 %) в опухолях пациентов с наличием и отсутствием ответа наблюдается в длинном плече 11 и 16 хромосом и коротком плече 18 хромосомы. У 83 % (25/30) больных с делецией 11q22.1-23.3 отмечается частичная регрессия при проведении НАХТ, а у 68 % (23/34) больных с нормальным состоянием региона отмечено отсутствие ответа на НАХТ. Наличие делеции в 11q22.1–23.3 регионе может выступать как маркер ожидаемой эффективности НАХТ с отношением шансов $OR=10,45$ (3,15–34,68) и относительным риском $RR=2,58$ (1,54–4,59) ($p=0,000047$ по критерию Фишера) с чувствительностью – 83 % и специфичностью – 68 %. При поправке Бонферрони уровень доверительной вероятности по критерию Фишера становится равным $p=0,04$. При делеции 18p11.21 отмечается 100 % специфичность, все больные с делецией имеют объективный клинический ответ на НАХТ.

Мы провели анализ предсказательной значимости сочетания «амплификационных» и «делеционных» маркеров. Если наблюдаются амплификации в 1q23.1-25.3 и/или делеции 11q22-24, то в 85 % (40/47) случаев отмечается частичная регрессия опухоли, если же у больных нормальное состояние 1q23.1-25.3 и 11q22-24 регионов, то в 86 % (18/21) случаев ответ на НАХТ отсутствует ($p=3,4 \times 10^{-8}$

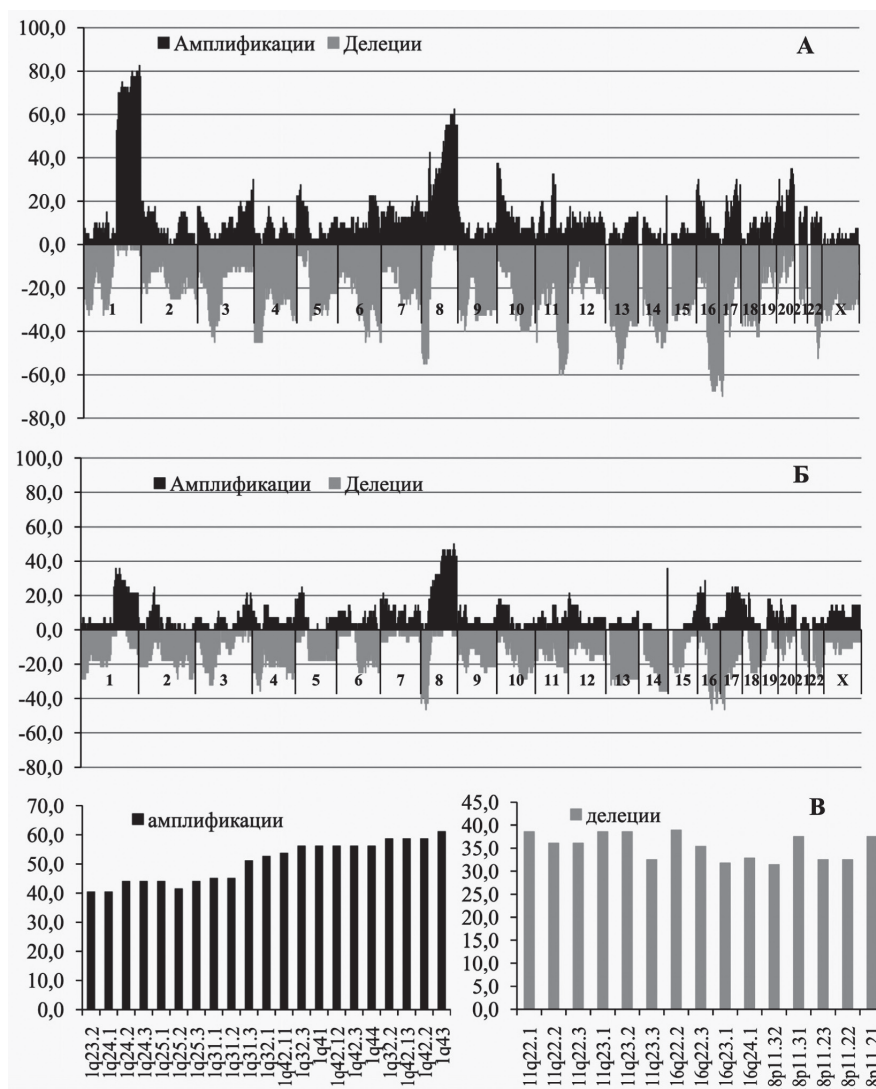


Рис. 2. Частота aberrаций числа копий ДНК в группе больных с объективным клиническим ответом (а) и с отсутствием ответа на НАХТ (б); в – цитобэнды, в которых наблюдалась наибольшая разность (и величина разности) в частоте амплификаций (слева) и делеций (справа) между опухолью пациентов с объективным клиническим ответом и отсутствием ответа.

Примечание: на рис. 1а и 1б по оси ординат – процент больных, несущих CNA (амплификации – выше оси абсцисс, делеции – ниже оси абсцисс), по оси абсцисс – цитобэнды (n=852), распределенные по хромосомам, на рис. 1в по оси ординат – разность в процентах; по оси абсцисс – цитобэнды, показавшие наибольшую разность

или $p=0,00003$ с поправкой Бонферрони). Другое возможное сочетание – амплификация в 1q43 и делеция 18p11.21 локусах. При наличии амплификации и/или делеции данных локусов в ДНК опухоли молочной железы у 92 % больных (35/38) отмечается объективный клинический ответ на НАХТ, при нормальном состоянии этих локусов у 81 % (21/26) больных отсутствует ответ на

химиотерапию. Использование сочетания CNA 1q43 и 18p11.21 локусов в качестве предсказательного маркера позволило бы прогнозировать эффективность НАХТ с $OR=49$ (10,61–226,33) и относительным риском $RR=4,78$ (2,17–10,78) (по критерию Фишера $p=2,3 \times 10^{-9}$ или $p=0,000002$ с поправкой Бонферрони), с чувствительностью – 92 %, специфичностью – 81 %.

Обсуждение

В настоящее время отсутствуют общепринятые критерии для прогнозирования эффективности НАХТ, решение о ее проведении принимается на основании клинических, морфологических характеристик опухоли и молекулярных подтипов [16]. ДНК микрочипы могут представлять больший интерес, по сравнению с экспрессионным анализом, для прогнозирования ожидаемой эффективности химиотерапии. Это обусловлено тем, что ДНК маркеры, в отличие от экспрессионных маркеров, относительно стабильны, а ДНК мутации и хромосомные аномалии являются основой процесса канцерогенеза и эволюции опухоли. Мутации и CNA связаны с экспрессией генов, например, мутация гена *BRCA1* 5382insC приводит к формированию стоп-кодона, при делециях экспрессия генов снижается, а при амплификациях – повышается [6, 14, 21]. Наконец, технология ДНК микрочипов может во многом нивелировать проблему внутриопухолевой гетерогенности [1, 3, 5], которая ограничивает применение экспрессионных чипов. ДНК-микрочипы позволяют с чувствительностью 5 % видеть одновременно весь спектр мутантных опухолевых клонов (генетический ландшафт опухоли). Все вышесказанное еще раз свидетельствует в пользу перспективности дальнейших исследований и валидации прогностической значимости найденных маркеров на независимых выборках.

Заключение

Таким образом, в результате исследования показана связь aberrаций числа копий ДНК опухоли молочной железы и эффективности предоперационной химиотерапии. На основе CNA идентифицированы новые информативные прогностические маркеры, которые с высоким уровнем достоверной вероятности и с учетом поправки на множественные сравнения показали связь с эффектом НАХТ. Сочетанное использование нескольких CNA маркеров повышает чувствительность (до 92 %) и специфичность (до 81 %) прогнозирования клинического эффекта в ответ на проведение системной терапии. Особую значимость представляет тот факт, что они могут определяться до начала лечения по биопсийному материалу.

Полученные данные обосновывают перспективность проведения дальнейших проспективных исследований, в которых можно было бы оценить значимость идентифицированных маркеров для

прогнозирования ожидаемой эффективности НАХТ и целесообразности ее проведения с целью индивидуализации выбора лечебной тактики.

Работа поддержана грантом РФФИ 13-04-98111 p_сибирь_a

ЛИТЕРАТУРА

1. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение // Биохимия. 2013. Т. 78, № 11. С. 1531–1549.
2. Гервас П.А., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Миллер С.В., Добродеев А.Ю., Гарбуков Е.Ю., Бабышкина Н.Н., Кухарев Я.В., Васильева М.В., Слонимская Е.М., Белявская В.А., Тузилов С.А., Чердынцева Н.В. Влияние полиморфизма генов апоптоза и репарации на эффективность неoadъювантной химиотерапии злокачественных новообразований // Сибирский онкологический журнал. 2009. № 4 (34). С. 41–47.
3. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Денисов Е.В. Основные достижения в фундаментальной онкологии в 2012 году // Практическая онкология. 2013. Т. 14, № 1. С. 1–12.
4. Bergamaschi A., Kim Y.H., Wang P., Sørlie T., Hernandez-Boussard T., Lonning P.E., Tibshirani R., Borresen-Dale A.L., Pollack J.R. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. // Genes Chromosomes and Cancer. 2006. Vol. 45 (11). P.1033–1040.
5. Bhatia S., Frangioni J.V., Hoffman R.M. The challenges posed by cancer heterogeneity // Nat. Biotechnol. 2012. Vol. 30. P. 604–610. doi: 10.1038/nbt.2294.
6. Byrski T., Gronwald J., Huzarski T., Grzybowska E., Budryk M., Stawicka M., Mierzwia T., Szwiec M., Wiśniowski R., Stolek M. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy // J. Clin. Oncol. 2010. Vol. 28 (3). P. 375–379. doi: 10.1200/JCO.2008.20.7019
7. Cai H., Kumar N., Baudis M. Arraymap: A reference resource for genomic copy number imbalances in human malignancies // PLoS ONE. 2012. Vol. 7 (5). E. 36944. doi: 10.1371/journal.pone.0036944.
8. Chin S.F., Teschendorff A.E., Marioni J.C., Wang Y., Barbosa-Morais N.L., Thorne N.P., Costa J.L., Pinder S.E., van De Wiel M.A., Green A.R. High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer // Genome Biol. 2007. Vol. 8 (10). R. 215.
9. Climent J., Dimitrow P., Fridlyand J., Palacios J., Siebert R., Albertson D.G., Gray J.W., Pinkel D., Lluch A., Martinez-Climent J.A. Deletion of chromosome 11q predicts response to anthracycline-based chemotherapy in early breast cancer // Cancer Res. 2007. Vol. 67 (2). P. 818–826.
10. Goldhirsch A., Winer E., Coates A., Gelber R., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.-J., Albain K.S., André F., Bergh J. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 // Ann. Oncol. 2013. Vol. 24 (9). P. 2206–2223. doi: 10.1093/annonc/mdt303.
11. Han S., Park K., Shin E., Kim H.-J., Kim J.Y., Kim J.Y., Gwak G. Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer // Oncol. Reports. 2010. Vol. 24 (1). P. 121–128.
12. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // Cell. 2011. Vol. 144 (5). P. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
13. Horlings H.M., Lai C., Nuyten D.S., Halfwerk H., Kristel P., van Beers E., Joosse S.A., Klijn C., Nederlof P.M., Reinders M.J. Integration of DNA copy number alterations and prognostic gene expression signatures in breast cancer patients // Clin. Cancer Res. 2010. Vol. 16 (2). P. 651–663. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0709
14. Huang N., Shah P.K., Li C. Lessons from a decade of integrating cancer copy number alterations with gene expression profiles // Brief. Bioinform. 2012. Vol. 13 (3). P. 305–316. doi: 10.1093/bib/bbr056.

15. Jönsson G., Staaf J., Vallon-Christersson J., Ringnér M., Holm K., Hegardt C., Gunnarsson H., Fagerholm R., Strand C., Agnarsson B.A. Research article Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics // *Breast Cancer Res.* 2010. Vol. 12 (3). R. 42. doi: 10.1186/bcr2596.
16. Kaufmann M., von Minckwitz G., Mamounas E.P., Cameron D., Carey L.A., Cristofanilli M., Denkert C., Eiermann W., Gnant M., Harris J.R. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer // *Ann. Surg. Oncol.* 2012. Vol. 19. P. 1508–1516. doi: 10.1245/s10434-011-2108-2. E
17. McClelland S.E., Burrell R.A., Swanton C. Chromosomal instability: a composite phenotype that influences sensitivity to chemotherapy // *Cell Cycle.* 2009. Vol. 8 (20). P. 3262–3266.
18. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania // *Breast J.* 2004. Vol. 10 (4). P. 273–294.
19. Weigman V.J., Chao H.-H., Shabalin A.A., He X., Parker J.S., Nordgard S.H., Grushko T., Huo D., Nwachukwu C., Nobel A. Basal-like Breast cancer DNA copy number losses identify genes involved in genomic instability, response to therapy, and patient survival // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. Vol. 133 (3). P. 865–880. doi: 10.1007/s10549-011-1846-y.
20. Wikman H., Sielaff-Frimpong B., Kropidlowski J., Witzel I., Milde-Langosch K., Sauter G., Westphal M., Lamszus K., Pantel K. Clinical Relevance of Loss of 11p15 in Primary and Metastatic Breast Cancer: Association with Loss of PRKCDP Expression in Brain Metastases // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7 (10). E. 47537. doi: 10.1371/journal.pone.0047537.
21. Xu Y., Duanmu H., Chang Z., Zhang S., Li Z., Li Z., Liu Y., Li K., Qiu F., Li X. The application of gene co-expression network reconstruction based on CNVs and gene expression microarray data in breast cancer // *Mol. Biol. Reports.* 2012. Vol. 39 (2). P. 1627–1637. doi: 10.1007/s11033-011-0902-3.
22. Zhang Y., Martens J.W., Jack X.Y., Jiang J., Sieuwerts A.M., Smid M., Klijn J.G., Wang Y., Foekens J.A. Copy number alterations that predict metastatic capability of human breast cancer // *Cancer Res.* 2009. Vol. 69 (9). P. 3795–3801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4596.
7. Cai H., Kumar N., Baudis M. Arraymap: A reference resource for genomic copy number imbalances in human malignancies // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7 (5). E. 36944. doi: 10.1371/journal.pone.0036944.
8. Chin S.F., Teschendorff A.E., Marioni J.C., Wang Y., Barbosa-Morais N.L., Thorne N.P., Costa J.L., Pinder S.E., van De Wiel M.A., Green A.R. High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer // *Genome Biol.* 2007. Vol. 8 (10). R. 215.
9. Climent J., Dimitrow P., Fridlyand J., Palacios J., Siebert R., Albertson D.G., Gray J.W., Pinkel D., Lluch A., Martinez-Climent J.A. Deletion of chromosome 11q predicts response to anthracycline-based chemotherapy in early breast cancer // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67 (2). P. 818–826.
10. Goldhirsch A., Winer E., Coates A., Gelber R., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.-J., Albain K.S., André F., Bergh J. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 // *Ann. Oncol.* 2013. Vol. 24 (9). P. 2206–2223. doi: 10.1093/annonc/mdt303.
11. Han S., Park K., Shin E., Kim H.-J., Kim J.Y., Kim J.Y., Gwak G. Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer // *Oncol. Reports.* 2010. Vol. 24 (1). P. 121–128.
12. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell.* 2011. Vol. 144 (5). P. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
13. Horlings H.M., Lai C., Nuyten D.S., Halfwerk H., Kristel P., van Beers E., Joosse S.A., Klijn C., Nederlof P.M., Reinders M.J. Integration of DNA copy number alterations and prognostic gene expression signatures in breast cancer patients // *Clin. Cancer Res.* 2010. Vol. 16 (2). P. 651–663. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0709.
14. Huang N., Shah P.K., Li C. Lessons from a decade of integrating cancer copy number alterations with gene expression profiles // *Brief. Bioinform.* 2012. Vol. 13 (3). P. 305–316. doi: 10.1093/bib/bbr056.
15. Jönsson G., Staaf J., Vallon-Christersson J., Ringnér M., Holm K., Hegardt C., Gunnarsson H., Fagerholm R., Strand C., Agnarsson B.A. Research article Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics // *Breast Cancer Res.* 2010. Vol. 12 (3). R. 42. doi: 10.1186/bcr2596.
16. Kaufmann M., von Minckwitz G., Mamounas E.P., Cameron D., Carey L.A., Cristofanilli M., Denkert C., Eiermann W., Gnant M., Harris J.R. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer // *Ann. Surg. Oncol.* 2012. Vol. 19. P. 1508–1516. doi: 10.1245/s10434-011-2108-2.
17. McClelland S.E., Burrell R.A., Swanton C. Chromosomal instability: a composite phenotype that influences sensitivity to chemotherapy // *Cell Cycle.* 2009. Vol. 8 (20). P. 3262–3266.
18. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania // *Breast J.* 2004. Vol. 10 (4). P. 273–294.
19. Weigman V.J., Chao H.-H., Shabalin A.A., He X., Parker J.S., Nordgard S.H., Grushko T., Huo D., Nwachukwu C., Nobel A. Basal-like Breast cancer DNA copy number losses identify genes involved in genomic instability, response to therapy, and patient survival // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. Vol. 133 (3). P. 865–880. doi: 10.1007/s10549-011-1846-y.
20. Wikman H., Sielaff-Frimpong B., Kropidlowski J., Witzel I., Milde-Langosch K., Sauter G., Westphal M., Lamszus K., Pantel K. Clinical Relevance of Loss of 11p15 in Primary and Metastatic Breast Cancer: Association with Loss of PRKCDP Expression in Brain Metastases // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7 (10). E. 47537. doi: 10.1371/journal.pone.0047537.
21. Xu Y., Duanmu H., Chang Z., Zhang S., Li Z., Li Z., Liu Y., Li K., Qiu F., Li X. The application of gene co-expression network reconstruction based on CNVs and gene expression microarray data in breast cancer // *Mol. Biol. Reports.* 2012. Vol. 39 (2). P. 1627–1637. doi: 10.1007/s11033-011-0902-3.
22. Zhang Y., Martens J.W., Jack X.Y., Jiang J., Sieuwerts A.M., Smid M., Klijn J.G., Wang Y., Foekens J.A. Copy number alterations that predict metastatic capability of human breast cancer // *Cancer Res.* 2009. Vol. 69 (9). P. 3795–3801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4596.

Поступила 21.02.14

REFERENCES

1. Gerashchenko T.S., Denisov E.V., Litvjakov N.V., Zav'jalova M.V., Vtorushin S.V., Cyganov M.M., Perel'muter V.M., Cherdynceva N.V. Intratumoral Heterogeneity: Nature and Biological Significance (review) // *Biohimija.* 2013. Vol. 78 (11). P. 1531–1549. [in Russian]
2. Gervas P.A., Litvjakov N.V., Staheeva M.N., Miller S.V., Dobrodeev A.Ju., Garbukov E.Ju., Babyshkina N.N., Kuharev Ja.V., Vasil'eva M.V., Slonimskaja E.M., Beljavskaja V.A., Tuzikov S.A., Cherdynceva N.V. Influence of apoptosis and repair gene polymorphism on neoadjuvant chemotherapy response of malignant tumors // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2009. № 4 (34). P. 41–47. [in Russian]
3. Cherdynceva N.V., Litvjakov N.V., Denisov E.V. Major advances in basic oncology in 2012 // *Prakticheskaja onkologija.* 2013. Vol. 14 (1). P. 1–12. [in Russian]
4. Bergamaschi A., Kim Y.H., Wang P., Sorlie T., Hernandez-Boussard T., Lonning P.E., Tibshirani R., Børresen-Dale A.L., Pollack J.R. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. // *Genes Chromosomes and Cancer.* 2006. Vol. 45 (11). P.1033–1040.
5. Bhatia S., Frangioni J.V., Hoffman R.M. The challenges posed by cancer heterogeneity // *Nat. Biotechnol.* 2012. Vol. 30. P. 604–610. doi: 10.1038/nbt.2294.
6. Byrski T., Gronwald J., Huzarski T., Grzybowska E., Budryk M., Stawicka M., Mierzwia T., Szwiec M., Wiśniowski R., Siolek M. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy // *J. Clin. Oncol.* 2010. Vol. 28 (3). P. 375–379. doi: 10.1200/JCO.2008.20.7019.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ микроРНК В ТКАНИ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Е.Г. Никитина^{1,2}, Л.Н. Уразова¹, О.В. Черемисина¹, Д.Е. Кульбакин^{1,2},
В.Н. Стегний²

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹

*Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск²
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail:ekatarinanikitina@gmail.com¹*

Малые некодирующие РНК (микроРНК) являются не только важнейшими регуляторами экспрессии генов, участвуя практически во всех базовых процессах в клетке, но и являются специфичными молекулами и могут быть использованы для многих целей в клинической диагностике. В данном исследовании проведена оценка уровня экспрессии микроРНК в опухолевой ткани пациентов с новообразованиями в разных анатомических сайтах головы и шеи. По результатам данного проекта получены новые данные относительно паттерна экспрессии восьми микроРНК в опухолевой ткани пациентов с раком гортани (РГ), языка (РЯ) и папиллярной карциномы щитовидной железы (РЩЖ), а именно микроРНК-18а, -21, -155, -200а, -200с, -205, -221 и -494. Определен спектр микроРНК, специфичных для анализируемых локализаций, что позволяет предположить наличие различий в механизмах участия одних и тех же микроРНК при онкогенезе опухолей разных эпитопов головы и шеи. Показано, что панель из микроРНК-200а, -200с, -21 и -205 является специфичной для определения двух локализаций (РГ и РЩЖ) и, вероятно, может быть использована для уточнения сайта вторичной опухоли и/или метастаза неясного генеза.

Ключевые слова: опухоли головы и шеи, микроРНК.

VARIABILITY AND microRNA EXPRESSION LEVEL IN TISSUES OF HEAD AND NECK TUMORS

E.G. Nikitina^{1,2}, L.N. Urazova¹, O.V. Cheremisinina¹, D.E. Kulbakin^{1,2}, S.N. Stegnyy²

Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk¹

National Research Tomsk State University, Tomsk²

5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia,

e-mail:ekatarinanikitina@gmail.com¹

Small non-coding RNAs (miRNAs) are not only an important regulator of gene expression by participating in almost all basic processes in the cell, but are specific molecules and can be used for many applications in clinical diagnostics. In our study, we assessed the level of miRNA expression in tumor tissue of patients with head and neck tumors of various sites. New data regarding the expression pattern of eight miRNAs in tumor tissue from patients with cancer of the larynx, tongue and papillary thyroid carcinoma, namely: miR-18a, -21, -155, -200a, -200c, -205, -221 and -494 were obtained. The spectrum of miRNA-specific localizations was analyzed, suggesting the existence of differences in the mechanisms of participation of the same miRNA in carcinogenesis of tumors of different epitopes of the head and neck. The panel of miR-200a, -200c, -21 and -205 was shown to be specific for determining the two locations (laryngeal and thyroid cancers) and probably can be used to define the site of a secondary tumor and / or metastasis of unknown origin. .

Key words: head and neck tumors, miRNA.

В структуре онкологической заболеваемости опухоли головы и шеи (ОГШ) занимают 5-е место в мире по частоте встречаемости и 6-е место – по летальности. В России ежегодно регистрируются более 80 тыс. больных с этой патологией. Наблюдается тенденция к увеличению уровня заболеваемости и смертности при ОГШ, на фоне стабилизации этих показателей для других локализаций [1]. В настоящее время достигнуты значительные успехи в терапии зло-

качественных опухолей головы и шеи, которые связаны с совершенствованием методов лечения, однако показатели 5-летней выживаемости, к сожалению, не превышают 50 % [14]. Предпосылкой успешного лечения является своевременная и точная диагностика, что позволяет повысить эффективность лечения, увеличить сроки безрецидивной выживаемости, а также улучшить качество жизни пациентов, снизив долю и тяжесть побочных эффектов [5].

Для ОГШ в качестве молекулярных биомаркеров для определения риска возникновения рака и неблагоприятного прогноза течения заболевания применяются мутации генов *EGFR*, *k-Ras*, *b-Raf*, *p53*, а также инфицирование онкогенными вирусами, в частности вирусом папилломы человека, Эпштейна–Барр и другими [14]. Открытие принципиально нового класса малых молекул РНК (микроРНК), которые регулируют экспрессию генов, стало весьма значительным событием в биологии конца XX века [13]. В ходе биогенеза микроРНК претерпевают ряд изменений – от молекулы при микроРНК длиной 1000 нуклеотидов к конечной форме зрелой микроРНК (около 25 нуклеотидов). Делеции в генах микроРНК, а также сбой механизма их созревания могут являться важным звеном процесса трансформации клетки [12]. МикроРНК не только регулируют многие ключевые процессы в жизнедеятельности клетки и поддержании ее гомеостаза, но и участвуют в патогенезе многих заболеваний, в том числе и онкологических [8, 16].

Показано, что отдельные микроРНК (-21, -18a, -200a, -200c, -205) играют ключевую роль в регуляции процессов апоптоза, роста, инвазии, пролиферации клеток [4, 10, 11], клеточного цикла (-18a, -21, -200a, -200c, -221, -494) [17]. Кроме того, отмечено их непосредственное участие в формировании иммунного ответа (микроРНК-155) [19]. Учитывая роль этих молекул в столь значимых фи-

зиологических процессах, логично предположить взаимосвязь экспрессии определенных микроРНК с патоморфологическими характеристиками опухоли и течением заболевания (развитие рецидивов, лимфогенных метастазов). Также существует возможность использования экспрессии определенного профиля микроРНК для идентификации происхождения ткани метастаза. Высказывается предположение о более высокой, чем у применяемых молекулярных маркеров, специфичности и чувствительности данного метода [7].

Крайняя противоречивость литературных данных не дает возможности составить четкие представления об участии тех или иных микроРНК-маркеров, которые бы обладали клинической значимостью в этиопатогенезе опухолей, локализованных, в частности, в области головы и шеи [2, 15]. Следовательно, представляется достаточно актуальным изучение микроРНК для оценки возможности применения в качестве потенциальных онкомаркеров, уровень экспрессии которых может быть специфичен для опухолей разных локализаций.

Целью исследования явилась оценка уровня и вариабельности экспрессии микроРНК в опухолевой ткани больных ОГШ.

Материал и методы

В исследование включены данные о 56 пациентах (таблица), получивших лечение в ФГБУ

Таблица

Характеристика групп больных

Параметры	Рак гортани (n=34)	Рак языка (n=13)	Рак щитовидной железы (n=6)
Возраст, лет			
<60	21 (62 %)	7 (54 %)	4 (67 %)
>60	13 (38 %)	6 (46 %)	2 (33 %)
Пол			
Муж	31 (91 %)	7 (54 %)	2 (33 %)
Жен	3 (9 %)	6 (46 %)	4 (67 %)
Стадия процесса			
I–II	14 (41 %)	3 (27 %)	2 (33 %)
III–IV	20 (59 %)	10 (73 %)	4 (67 %)
Состояние регионарных лимфоузлов			
N ₀	25 (74 %)	5 (38 %)	3 (50 %)
N ₊	9 (26 %)	8 (62 %)	3 (50 %)
Гистотип опухоли			
Эпителиальный рак	35 (100 %)	13 (100 %)	–
Папиллярный рак	–	–	6 (100 %)

«НИИ онкологии» СО РАМН. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ президента РФ, от 24.12.93 № 2288). На исследование получено разрешение этического комитета ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН.

В работе был использован парный операционный/биопсийный материал (опухолевая и прилежащая условно-нормальная ткань) от пациентов с первичным диагнозом плоскоклеточного рака гортани ($n=34$), языка ($n=13$) и папиллярной карциномы щитовидной железы ($n=6$). Диагноз пациентов морфологически верифицирован. Транспортировку и хранение (при -80°C) биоматериала осуществляли в пробирках типа Eppendorf в консервирующем растворе RNAlater (Sigma, USA). Тотальная фракция РНК из ткани была выделена набором реагентов mirVana™ (Ambion, USA). Количество РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000 (ThermoScientific, USA) (выход продукта варьировал от 30 до 800 нг/мкл, $A_{260/280}=1,99$). Целостность РНК оценивали на капиллярном электрофорезе на приборе TapeStation 2200 (Agilent Technologies, USA). Среднее значение RIN (RNA Integrity Number) составило 8,77 (от 8,3 до 9,0), что свидетельствует о высоком качестве образцов и пригодности их к анализу методом количественной ПЦР в режиме реального времени.

Мультиплексная обратная транскрипция была проведена с использованием специфичных к определенным микроРНК (hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-221-3p, hsa-miR-494-3p) праймерам особой шпильчатой конструкции (Iyevleva A., et al 2012). Все реакции ПЦР в режиме реального времени проведены в триплете согласно протоколу [9]. В качестве гена-рефери выбрана микроРНК-103 [9], калибровка выполнена относительно нормальной ткани, уровень экспрессии микроРНК рассчитан согласно методу Pfaffl [18]. В качестве результата использовано логарифмически трансформированное по основанию e нормализованное значение уровня экспрессии ($\ln(\text{fold}+0,02)$). Дискриминантный и корреляционный анализ, а также обработка данных с применением U-критерия Манна – Уитни проводились в программе Statistica 8.0.

Результаты исследования

Проведенный анализ экспрессии микроРНК в опухоли относительно прилежащей условно-нормальной ткани для 8 микроРНК (-18a, -21, -155, 200a, -200c, -205, -221 и -494) на примере 3 локализаций выявил aberrантную экспрессию некоторых микроРНК в обследованных группах (рис. 1).

Для микроРНК-21 и -155 наблюдается тенденция к увеличению экспрессии в опухолевой ткани у всех обследованных пациентов (рис. 1А), что свидетельствует о выполнении ими определенной роли в канцерогенезе изученных локализаций. Полученные результаты согласуются с представленными в мировой литературе данными. МикроРНК-21, которую относят к онкогенным, является классическим примером дезрегуляции микроРНК при онкологических заболеваниях, что подтверждено рядом экспериментов. МикроРНК-21 участвует практически во всех процессах, которые способствуют перерождению нормальной клетки в опухолевую (регулируя пролиферацию, клеточный рост, а также способность клеток к инвазии и миграции), что было продемонстрировано на примере многих локализаций, в частности глиобластоме, раке молочной железы, яичников, желудка, печени и др. [11]. МикроРНК-155, помимо непосредственного участия в регуляции формирования иммунного ответа [19], также играет роль и в онкогенезе, однако в литературе эти данные противоречивы. В обзорной статье Z. Chen et al. представили данные, позволяющие заключить, что микроРНК-155 может выступать как в роли онкогена, что показано на примере рака молочной железы, легкого, лимфоме, так и онкосупрессора – как в случае меланомы [3].

В своих исследованиях мы установили, что другие изученные микроРНК демонстрируют разнонаправленное изменение уровня экспрессии в обследуемых группах пациентов (рис. 1Б-Г). Следует отметить, что в опухолевой ткани больных раком языка выявлена значительная гиперэкспрессия не только микроРНК-21, -155, но и микроРНК-200с (72 % случаев, отмечены $\ln>0$), а также гипэкспрессия микроРНК-494 (100 % случаев – $\ln<0$). Во всех исследованных образцах опухолевой ткани пациентов с диагнозом папиллярной карциномы щитовидной железы показана гиперэкспрессия микроРНК-155, -200а и гипэкспрессия микроРНК-205, в то время как для микроРНК-21 и -221 при повышенной их экспрессии в большинстве случа-

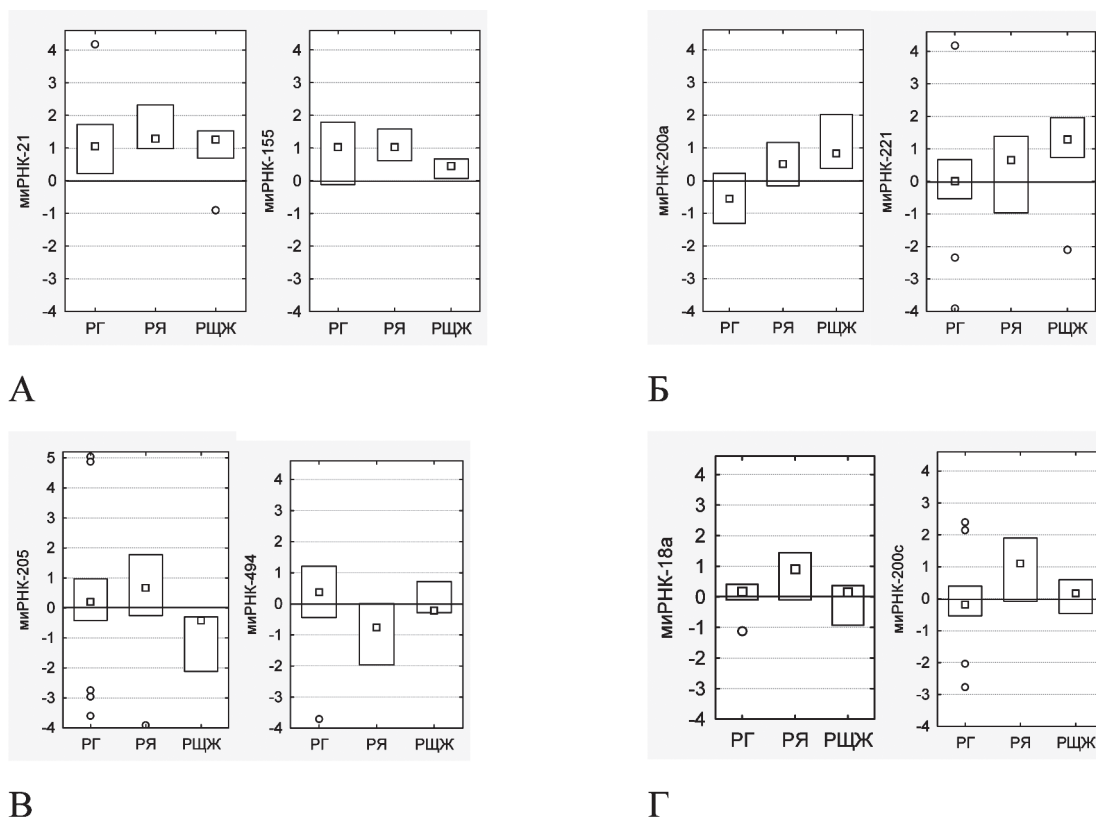


Рис. 1. Уровень экспрессии микроРНК в патологически измененной опухолевой ткани относительно условно-нормальной (значение нормы экспрессии – 0). Примечание: РГ – рак гортани; РЯ – рак языка; РЩЖ – рак щитовидной железы

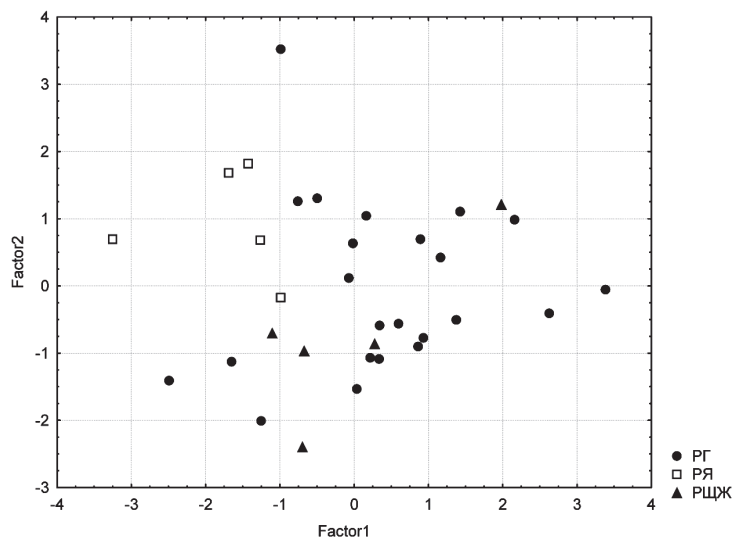


Рис. 2. Расположение объектов в пространстве на плоскости дискриминантных осей. Примечание: Factor 1 и 2 – условное значение, объединяющее данные по экспрессии анализируемых микроРНК. Точками, квадратами и ромбами отмечены пациенты с диагнозом РГ, РЯ и РЩЖ соответственно

ев наблюдаются и единичные выбросы значений изученных показателей. Вероятно, эти микроРНК могут играть определенную роль в канцерогенезе изученных локализаций (рис. 1), что, однако, требует уточнения на более репрезентативных группах, унифицированных по анамнестическим и клинкоморфологическим показателям.

Сравнительный анализ уровня экспрессии каждой из анализируемых микроРНК между локализациями значимых различий в изученных показателях не выявил. Однако дискриминантный анализ показал, что есть значимое различие в значениях уровня экспрессии между 3 сравниваемыми группами ($F(4,58)=4.094$, $p<0,0054$), что позволяет судить о наличии специфичности экспрессии некоторых микроРНК в группах (рис. 2). Несмотря на разброс значений, что, вероятно, связано с гетерогенностью выборок по таким показателям, как пол, возраст и TNM (таблица), наблюдается тенденция к группированию случаев согласно диагнозу (рис. 2).

Обсуждение

Проведенный анализ позволил выделить микроРНК (-200a, -200c, -21 и -205), которые формируют специфичную картину экспрессии в группе и позволяют отнести анализируемые образцы к определенной локализации. Панель вышеперечисленных микроРНК специфична и с вероятностью 93,5 % или 66,6 % позволяет отнести анализируемые образцы к плоскоклеточной карциноме гортани или к папиллярной карциноме щитовидной железы соответственно. Кроме того, корреляционный анализ также выявил наличие связи между этими микроРНК. Наблюдалась положительная корреляция между микроРНК-200c и микроРНК-200a, -205 ($r=0,44$ и $r=0,53$ соответственно), а также между микроРНК-21 и -155 ($r=0,51$). Следует отметить, что все эти микроРНК объединяет участие в регуляции апоптоза, клеточного роста, инвазии и пролиферации [4, 10, 11, 21]. При этом микроРНК-200a, -200c, -205 играют определенную роль и в регуляции клеточного цикла [11, 20, 21]. В литературе широко представлены данные о значительной роли представителей семейства микроРНК-200, а также микроРНК-205 в онкогенезе, в частности, в эпителиально-мезенхимальном переходе и процессе приобретения клеткой эмбрионального фенотипа. Многочисленные исследования показали онкосупрессорную роль микроРНК-200

в канцерогенезе опухолей мочевого пузыря, молочной железы, рото- и носоглотки и др. [6]. Для микроРНК-205 свойственна двойственная роль в онкогенезе в зависимости от локализации опухоли и мишеней этой молекулы. Так, при раке молочной железы показана ее гипокспрессия, в то время как при опухолях легкого, мочевого пузыря, яичника, головы и шеи выявлена гиперэкспрессия этой микроРНК [21].

Полученные нами результаты позволили представить специфичную картину экспрессии изученных микроРНК в опухолевой ткани относительно прилежащей условно нормальной при трех локализациях опухолей в области головы и шеи – плоскоклеточном раке гортани и языка, а также папиллярной карциноме щитовидной железы, что может внести определенный вклад в имеющиеся литературные данные относительно роли микроРНК в процессах канцерогенеза. При этом различия в спектре их экспрессии в обследованных группах больных позволяют предположить отличия в механизмах их участия в процессе канцерогенеза опухолей отдельных локализаций.

Несмотря на отсутствие значимых различий по отдельным микроРНК между группами, статистический анализ позволил выявить микроРНК, формирующих специфичную картину экспрессии и позволяющих идентифицировать локализацию опухоли, что может быть использовано для уточнения сайта первичной или вторичной злокачественной опухоли и/или метастаза неясного генеза. Представляется целесообразным продолжить исследования с привлечением более многочисленных и унифицированных по анамнестическим и клинкоморфологическим показателям групп пациентов, что даст возможность получить новые данные относительно механизмов участия микроРНК в канцерогенезе опухолей различных локализаций, а также возможных аспектах использования в качестве диагностических и прогностических молекулярных маркеров в клинической онкологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №12-04-31505) и гранта НШ-1279.2014.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2011 году (заболеваемость и смертность). М., 2013. 289 с.

2. Chen D., Cabay R.J., Jin Y., Wang A., Lu Y., Shah-Khan M., Zhou X. MicroRNA Deregulations in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas // J. Oral Maxillofac. Res. 2013. Vol. 4 (1). e2.
3. Chen Z., Ma T., Huang C., Hu T., Li J. The pivotal role of microRNA-155 in the control of cancer // J. Cell Physiol. 2014. Vol. 229 (5). P. 545–550. doi: 10.1002/jcp.24492.
4. Cochrane D.R., Howe E.N., Spoelstra N.S., Richer J.K. Loss of miR-200c: A Marker of Aggressiveness and Chemoresistance in Female Reproductive Cancers // J. Oncol. 2010. Vol. 2010: 821717. doi: 10.1155/2010/821717.
5. Etzioni R., Urban N., Ramsey S., McIntosh M., Schwartz S., Reid B., Radich J., Anderson G., Hartwell L. The case for early detection // Nat. Rev. Cancer. 2003. Vol. 3 (4). P. 243–252.
6. Feng X., Wang Z., Fillmore R., Xi Y. MiR-200, a new star miRNA in human cancer // Cancer Lett. 2014. Vol. 344 (2). P. 166–173. doi: 10.1016/j.canlet.2013.11.004.
7. Ferracin M., Veronese A., Negrini M. Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis // Expert Rev. Mol. Diagn. 2010. Vol. 3. P. 297–308. doi: 10.1586/erm.10.11.
8. Garofalo M., Croce C.M. MicroRNAs: master regulators as potential therapeutics in cancer // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2011. Vol. 51. P. 25–43. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010510-100517.
9. Iyevleva A.G., Kuligina E.Sh., Mitiushkina N.V., Togo A.V., Miki Y., Imanyantov E.N. High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas // Breast Cancer Res. Treat. 2012. Vol. 131 (3). P. 1049–1059. doi: 10.1007/s10549-011-1845-z.
10. Korpai M., Lee E.S., Hu G., Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2 // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283 (22). P. 14910–14914. doi: 10.1074/jbc.C800074200.
11. Krichevsky A.M., Gabriele G. MiR-21: a small multi-faceted RNA // J. Cell Mol. Med. 2009. Vol. 13 (1). P. 39–53. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x.
12. Kumar M.S., Lu J., Mercer K.L., Golub T.R., Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis // Nat. Genet. 2007. Vol. 39 (5). P. 673–677.
13. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 // Cell. 1993. Vol. 75. P. 843–854.
14. Mydlarz W.K., Hennessey P.T., Califano J.A. Advances and Perspectives in the Molecular Diagnosis of Head and Neck Cancer // Expert Opin. Med. Diagn. 2010. Vol. 4 (1). P. 53–65.
15. Nagadia R., Pandit P., Coman W.B., Cooper-White J., Punyadeera C. miRNAs in head and neck cancer revisited // Cell Oncol. (Dordr). 2013. Vol. 36 (1). P. 1–7. doi: 10.1007/s13402-012-0122-4.
16. Nikitina E.G., Urazova L.N., Stegny V.N. MicroRNAs and human cancer // Exp. Oncol. 2012. Vol. 34 (1). P. 2–8.
17. O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., Dang C.V., Mendell J.T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression // Nature. 2005. Vol. 435 (7043). P. 839–843.
18. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucleic Acids Res. 2001. Vol. 29 (9). e45.
19. Teng G., Papavasiliou F.N. Shh! Silencing by microRNA-155 // Philos. Trans. R Soc Lond B Biol Sci. 2009. Vol. 364 (1517). P. 631–637. doi: 10.1098/rstb.2008.0209.
20. Uhlmann S., Zhang J.D., Schwäger A., Mannsperger H., Riazalhosseini Y., Burmester S., Ward A., Korf U., Wiemann S., Sahin O. MiR-200bc/429 cluster targets PLCGamma1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer // Oncogene. 2010. Vol. 29. P. 4297–4306. doi: 10.1038/onc.2010.201.
21. Wu H., Zhu S., Mo Y.Y. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer // Cell Res. 2009. Vol. 19 (4). P. 439–448. doi: 10.1038/cr.2009.18.

Поступила 12.05.14

REFERENCES

1. Chissov V.I., Starinskij V.V., Petrova G.V. Malignancies in Russia in 2011 (morbidity and mortality). M., 2013. 289 p. [in Russian]
2. Chen D., Cabay R.J., Jin Y., Wang A., Lu Y., Shah-Khan M., Zhou X. MicroRNA Deregulations in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas // J. Oral Maxillofac. Res. 2013. Vol. 4 (1). e2.
3. Chen Z., Ma T., Huang C., Hu T., Li J. The pivotal role of microRNA-155 in the control of cancer // J. Cell Physiol. 2014. Vol. 229 (5). P. 545–550. doi: 10.1002/jcp.24492.
4. Cochrane D.R., Howe E.N., Spoelstra N.S., Richer J.K. Loss of miR-200c: A Marker of Aggressiveness and Chemoresistance in Female Reproductive Cancers // J. Oncol. 2010. Vol. 2010: 821717. doi: 10.1155/2010/821717.
5. Etzioni R., Urban N., Ramsey S., McIntosh M., Schwartz S., Reid B., Radich J., Anderson G., Hartwell L. The case for early detection // Nat. Rev. Cancer. 2003. Vol. 3 (4). P. 243–252.
6. Feng X., Wang Z., Fillmore R., Xi Y. MiR-200, a new star miRNA in human cancer // Cancer Lett. 2014. Vol. 344 (2). P. 166–173. doi: 10.1016/j.canlet.2013.11.004.
7. Ferracin M., Veronese A., Negrini M. Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis // Expert Rev. Mol. Diagn. 2010. Vol. 3. P. 297–308. doi: 10.1586/erm.10.11.
8. Garofalo M., Croce C.M. MicroRNAs: master regulators as potential therapeutics in cancer // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2011. Vol. 51. P. 25–43. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010510-100517.
9. Iyevleva A.G., Kuligina E.Sh., Mitiushkina N.V., Togo A.V., Miki Y., Imanyantov E.N. High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas // Breast Cancer Res. Treat. 2012. Vol. 131 (3). P. 1049–1059. doi: 10.1007/s10549-011-1845-z.
10. Korpai M., Lee E.S., Hu G., Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2 // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283 (22). P. 14910–14914. doi: 10.1074/jbc.C800074200.
11. Krichevsky A.M., Gabriele G. MiR-21: a small multi-faceted RNA // J. Cell Mol. Med. 2009. Vol. 13 (1). P. 39–53. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x.
12. Kumar M.S., Lu J., Mercer K.L., Golub T.R., Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis // Nat. Genet. 2007. Vol. 39 (5). P. 673–677.
13. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 // Cell. 1993. Vol. 75. P. 843–854.
14. Mydlarz W.K., Hennessey P.T., Califano J.A. Advances and Perspectives in the Molecular Diagnosis of Head and Neck Cancer // Expert Opin. Med. Diagn. 2010. Vol. 4 (1). P. 53–65.
15. Nagadia R., Pandit P., Coman W.B., Cooper-White J., Punyadeera C. miRNAs in head and neck cancer revisited // Cell Oncol. (Dordr). 2013. Vol. 36 (1). P. 1–7. doi: 10.1007/s13402-012-0122-4.
16. Nikitina E.G., Urazova L.N., Stegny V.N. MicroRNAs and human cancer // Exp. Oncol. 2012. Vol. 34 (1). P. 2–8.
17. O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Zeller K.I., Dang C.V., Mendell J.T. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression // Nature. 2005. Vol. 435 (7043). P. 839–843.
18. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucleic Acids Res. 2001. Vol. 29 (9). e45.
19. Teng G., Papavasiliou F.N. Shh! Silencing by microRNA-155 // Philos. Trans. R Soc Lond B Biol Sci. 2009. Vol. 364 (1517). P. 631–637. doi: 10.1098/rstb.2008.0209.
20. Uhlmann S., Zhang J.D., Schwäger A., Mannsperger H., Riazalhosseini Y., Burmester S., Ward A., Korf U., Wiemann S., Sahin O. MiR-200bc/429 cluster targets PLCGamma1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer // Oncogene. 2010. Vol. 29. P. 4297–4306. doi: 10.1038/onc.2010.201.
21. Wu H., Zhu S., Mo Y.Y. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer // Cell Res. 2009. Vol. 19 (4). P. 439–448. doi: 10.1038/cr.2009.18.

КЛИНИКО-ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МИЕЛОФИБРОЗА ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Ю.А. Дьячкова, Т.Ю. Долгих, Н.П. Домникова

*НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, г. Новосибирск, 630117,
г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2, e-mail: pathol@soramn.ru*

Проведено патоморфологическое исследование миелофиброза (МФ) у пациентов с множественной миеломой путём использования программы морфометрического анализа изображений. Выявлено, что МФ встречается в 1,5 раза чаще при рецидиве заболевания, чем в дебюте и при ответе на химиотерапию. Наиболее высокая относительная площадь фиброзной ткани при МФ II и III степеней наблюдается при рецидиве множественной миеломы. Обнаружена прямая корреляция между относительной площадью опухолевой ткани в костном мозге и относительной площадью фиброзной ткани при МФ I и II степеней. У больных с рецидивом заболевания чаще выявляется миелофиброз II и III степеней. Частота и степень выраженности миелофиброза не связаны с полом и возрастом пациентов.

Ключевые слова: множественная миелома, миелофиброз, относительная площадь фиброзной ткани, относительная площадь опухолевой ткани.

CLINICO-PATHOMORPHOLOGICAL STUDY OF MYELOFIBROSIS IN MULTIPLE MYELOMA

Yu.A. Dyachkova, T.Yu. Dolgikh, N.P. Domnikova

*Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology of Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences,
Novosibirsk*

2, Timakova Street, 630117-Novosibirsk, 2, Russia, e-mail: pathol@soramn.ru

Pathomorphology study of bone marrow fibrosis in patients with multiple myeloma by using morphometric image analysis software was performed. It was revealed that bone marrow fibrosis occurs 1.5 times more frequently in relapse of disease than in the initial presentation of the disease and in response to chemotherapy. The highest relative area of fibrous tissue in marrow fibrosis of 2nd and 3rd grade is observed in relapsed multiple myeloma. There is a direct correlation between the relative area of the tumor tissue in the bone marrow and the relative area of fibrous tissue in bone marrow fibrosis of the 1st and the 2nd grade. Chemotherapy is a factor associated with bone marrow fibrosis of the 2nd and the 3rd grade. Gender and age of the patients are not associated with marrow fibrosis.

Key words: multiple myeloma, myelofibrosis, the relative area of fibrous tissue, the relative area of the tumor tissue.

В настоящее время активно изучается роль миелофиброза (МФ) при множественной миеломе. Выраженный МФ прямо коррелирует с числом низкодифференцированных плазматических клеток, митотической активностью, которые являются неблагоприятными прогностическими маркерами. Данные литературы свидетельствуют, что одновременное морфологическое исследование как опухолевых клеток, так и МФ во время мониторинга множественной миеломы более прогностически значимо, чем изолированное исследование опухолевого субстрата [3]. У пациентов с множественной миеломой и выраженным МФ медиана выживаемости составляет 11 мес, что значительно короче, чем у больных без выраженного МФ [5, 9, 10]. Миелофиброз может развиваться у 10–30 % больных множественной миеломой в развернутых

стадиях болезни, после проведения нескольких линий химиотерапии (ХТ) [2]. Однако остаётся неясным, имеет ли значение объём опухолевой массы в костном мозге для возникновения МФ при множественной миеломе. В литературе также недостаточно освещён вопрос о влиянии химиотерапии на МФ при множественной миеломе.

Цель исследования: изучить патоморфологические особенности МФ при множественной миеломе в зависимости от объёма опухолевого поражения костного мозга и проведения химиотерапии.

Материал и методы

Обследовано 42 пациента с множественной миеломой, находившихся на лечении в ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница» с 2006 по 2012 г. Пациенты были разделены на три группы (табл. 1):

1-я группа – дебют заболевания (до ХТ), 2-я группа – больные, ответившие на ХТ (ответ – не менее минимального), 3-я группа – рецидив заболевания (до начала очередной линии ХТ).

Во 2-й группе химиотерапии I линию получили 9, II линии – 5 больных. В 3-й группе ХТ I линии получили 5, II линии – 2 больных. Лечение проводилось по схемам, содержащим не менее двух из следующих препаратов: мельфалан, преднизолон, циклофосфамид, бортезомиб, дексаметазон. Для верификации диагноза, стадирования, оценки результатов лечения множественной миеломы использовали стандартные подходы: критерии Y. Huang et al. (1999), Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфо-пролиферативных заболеваний (2013), критерии B.G.M. Durie, S.E. Salmon (1975), ISS (2005), критерии Европейской группы трансплантации крови и костного мозга – EBMT (1998) [1, 4, 6–8].

Степень МФ устанавливали согласно шкале Европейского консенсуса [12]. МФ 0 степени характеризовался беспорядочно расположенными линейными ретикулиновыми волокнами без взаимопересечений, соответствующими нормальному костному мозгу; МФ I степени соответствовала рыхлая сеть ретикулиновых волокон со множеством взаимопересечений, особенно в околососудистой области; для МФ II степени было характерно диффузное и плотное увеличение ретикулиновых волокон с обширными пересечениями, иногда с наличием пучков коллагена и/или фокального остеосклероза; МФ III степени соответствовало диффузное и плотное увеличение

ретикулиновых волокон с обширными пересечениями с грубыми пучками коллагена, часто ассоциированное с первичным остеосклерозом. Миелофиброз I степени расценивали как начальный фиброз, МФ II и III степени – как выраженный [11].

Автоматизированное морфометрическое исследование МФ проводили с использованием программы анализа изображений AxioVision 4.6, камеры Axio Cam, микроскопа Zeiss, компьютера. В парафиновых срезах трепанобиоптатов подвздошной кости толщиной 4 мкм, импрегнированных серебром по методу Гомори и окрашенных по методу Ван Гизона, при $\times 200$ измеряли абсолютную площадь фиброзной ткани. Абсолютную площадь гемопоэтической и опухолевой ткани измеряли в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Изучали все костномозговые полости одного среза, что соответствовало 5–7 полям зрения микроскопа и 20–30 полям зрения камеры (в зависимости от размера среза). Площадь одного поля зрения камеры известна и составляла 364 000 мкм² (0,7 мм²). Площадь фиброзной ткани оценивали относительно гемопоэтической ткани. Сложив площадь фиброзной ткани во всех полях зрения камеры, получали суммарную абсолютную площадь фиброзной ткани в пределах одного среза. Аналогичным образом получали суммарную абсолютную площадь гемопоэтической и опухолевой ткани. Затем вычисляли относительную площадь фиброзной ткани ($S_{\text{оти.фибр.тк.}}$) по формуле

$$S_{\text{оти.фибр.тк.}} = S_{\text{фибр.тк.}} / S_{\text{гемопоэт.тк.}} \times 100\%,$$

где $S_{\text{фибр.тк.}}$ – суммарная абсолютная площадь

Таблица 1

Характеристика групп больных

Параметры	1-я группа (n=21)	2-я группа (n=14)	3-я группа (n=7)
Мужчины	8	6	2
Женщины	13	8	5
Возраст, лет			
Мужчины	66,75 ± 3,18	60,33 ± 4,72	65,0 ± 6,0
Женщины	58,08 ± 3,43	53,25 ± 2,23	63,2 ± 2,75
Стадия по S-Durie			
I	7	1	1
II	6	6	3
III	7	3	3

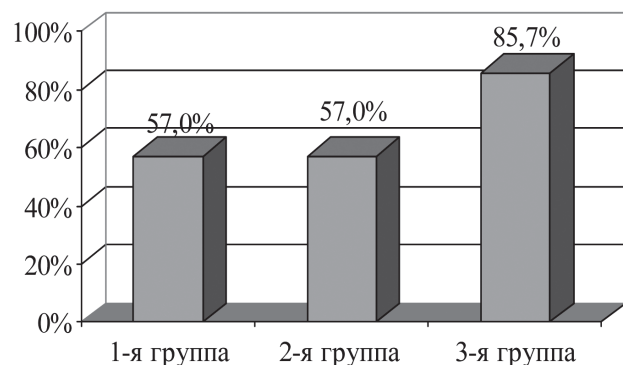


Рис. 1. Частота миелофиброза при множественной миеломе в различные фазы заболевания

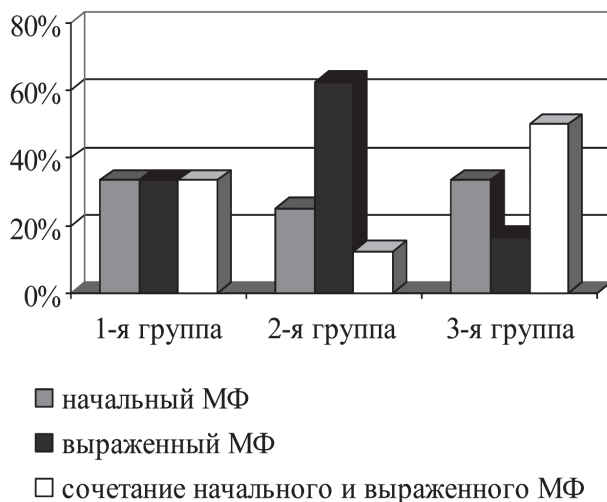


Рис. 2. Частота миелофиброза различной степени выраженности при множественной миеломе в различные фазы заболевания

фиброзной ткани, $S_{\text{гемопозт.тк.}}$ – суммарная абсолютная площадь гемопоэтической ткани. Площадь опухолевой ткани оценивали относительно нормальной гемопоэтической, костной и жировой тканей. Относительную площадь опухолевой ткани ($S_{\text{отн.опух.тк.}}$) вычисляли по формуле $S_{\text{отн.опух.тк.}} = S_{\text{опух.тк.}} / (n \times 364\,000) \times 100\%$, где $S_{\text{опух.тк.}}$ – суммарная абсолютная площадь опухолевой ткани, n – число проанализированных полей зрения, 364 000 – площадь одного поля зрения камеры.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS (версия 17.0). Результаты представлены в виде $M \pm \sigma$, где M – среднее арифметическое значение, σ – стандартное отклонение, а также $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, а m – средняя ошибка средней арифметической. Сравнения средних значений различных выборок производили с помощью U-теста по методу Манна – Уитни. Связь между двумя переменными определяли с помощью коэффициентов корреляции Пирсона и Спирмана. Для однофакторного и многофакторного анализа использовали модель логистической регрессии. Критериями достоверности считали значения вероятности ошибки $p < 0,05$ и отношения шансов (OR) $> 1,0$.

Результаты и обсуждение

При рецидиве множественной миеломы МФ встречается в 1,5 раза чаще, чем в дебюте заболевания и у пациентов, ответивших на химиотерапию (рис. 1). В пределах одного среза трепанобиоптатов встречалось сочетание различных степеней МФ, при этом в 1-й группе пациентов с равной

Таблица 2

Уровень $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ в различные фазы множественной миеломы

Группы пациентов	$S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ при МФ I ст.	$S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ при МФ II ст.	$S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ при МФ III ст.
1-я группа (n=21)	$13,67 \pm 20,22\%$	$1,50 \pm 2,43\%*$	$8,83 \pm 9,76\%*$
2-я группа (n=14)	$30,20 \pm 33,27\%$	$1,40 \pm 2,80\%**$	$3,90 \pm 6,14\%**$
3-я группа (n=7)	$10,17 \pm 16,18\%$	$10,0 \pm 22,13\%$	$16,17 \pm 37,20\%$
p	$p_{1,2}=0,014$	$p_{1,3}<0,001$ $p_{2,3}<0,001$	$p_{1,3}<0,001$ $p_{2,3}<0,001$

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с показателем у больных с МФ I степени в дебюте заболевания при ($p < 0,001$); ** – различия статистически значимы по сравнению с показателями у пациентов с МФ I степени, ответивших на химиотерапию ($p < 0,001$).

частотой (рис. 2). Обнаружено, что у пациентов, ответивших на ХТ, преобладало сочетание начального и выраженного МФ, в то время как при рецидиве заболевания преобладал выраженный МФ, при этом чаще встречался МФ II и III степеней. У пациентов всех 3 групп начальный МФ встречался примерно с одинаковой частотой (в 1-й группе – в 33,0 %, во 2-й группе – в 25,0 %, в 3-й группе – в 33,0 %).

Изучение величины $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ при МФ I, II и III степеней в сравниваемых группах показало (табл. 2), что у пациентов в дебюте заболевания и ответивших на химиотерапию преобладает МФ I степени, при котором $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ превысила $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ при МФ II и III степеней ($p < 0,05$). При этом уровень $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ у пациентов с МФ I степени, ответивших на химиотерапию, значимо больше, чем у больных в дебюте заболевания.

При рецидивах множественной миеломы уровень $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ при МФ II степени выше, чем аналогичный показатель у больных в дебюте заболевания и ответивших на ХТ. – $10,0 \pm 22,13$ %, $1,50 \pm 2,43$ % и $1,40 \pm 2,80$ % соответственно ($p < 0,05$). Аналогичные данные получены при оценке $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ при МФ II и III степени у больных в сравниваемых группах – $16,17 \pm 37,20$ %, $8,83 \pm 9,76$ % и $3,90 \pm 6,14$ % соответственно ($p < 0,05$).

По данным корреляционного анализа, при МФ I степени и МФ II степени $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ прямо коррелирует с $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ ($r = 0,390$, $p = 0,040$ при МФ I ст.; $r = 0,390$, $p = 0,040$ при МФ II ст.). Результаты многофакторного анализа показали, что МФ I степени ассоциирован с наличием опухолевого поражения костного мозга ($p = 0,036$, $OR = 1,10$; $CI = 1,91-45,58$) и не связан с возрастом ($p = 0,276$, $OR = 1,55$; $CI = 0,71-3,40$), полом ($p = 0,196$, $OR = 2,87$; $CI = 0,58-14,16$) и схемой проводимой ХТ ($p = 0,186$, $OR = 2,58$; $CI = 0,63-10,53$).

Частота МФ при множественной миеломе в данном исследовании оказалась выше, чем указанная в других работах [2]. Это связано с тем, что мы применяли дополнительные критерии оценки МФ. Помимо общепринятой шкалы Европейского консенсуса нами использована программа для морфометрического анализа изображений. Во внимание принимались не только срезы трепанобиоптатов, по всей площади представленные фиброзными волокнами, но и те срезы, в которых

наряду с участками, занятыми фиброзной тканью, отмечались поля костного мозга, свободные от ретикулиновых и коллагеновых волокон.

Заключение

Таким образом, при множественной миеломе существуют количественные взаимосвязи опухоли и МФ. В исследовании выявлена ассоциация МФ I степени с наличием опухолевого поражения костного мозга, при МФ II степени обнаружена прямая корреляция между $S_{\text{отн.опух.тк.}}$ и $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ а также между $S_{\text{отн.опух.тк.}}$ и $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$. У больных с рецидивом множественной миеломы с МФ II и III степеней уровень $S_{\text{отн.фибр.тк.}}$ больше, чем при других фазах заболевания. Миелофиброз в 1,5 раза чаще наблюдается при рецидиве, чем в дебюте заболевания или при ответе на химиотерапию. Отсутствие взаимосвязи МФ при множественной миеломе с возрастом и полом пациента подтверждает патологический характер данного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний / Под ред. И.В. Поддубной, В.Г. Савченко. М.: Медиа Медика, 2013. 104 с.
2. Abildgaard N., Bendix-Hansen K., Kristensen J.E., Vejlgard T., Risteli L., Nielsen J.L., Heickendorff L. Bone marrow fibrosis and disease activity in multiple myeloma monitored by the aminoterminal propeptide of procollagen III in serum // Br. J. Haematol. 1997. Vol. 99 (3). P. 641–648.
3. Babarović E., Valković T., Štifter S., Budisavljević I., Seili-Bekafigo I., Duletić-Načinović A., Lučin K., Jonjić N. Assessment of bone marrow fibrosis and angiogenesis in monitoring patients with multiple myeloma // Am. J. Clin. Pathol. 2012. 137 (6): 870–8. doi: 10.1309/AJCPT5Y2JRI-UUCUB.
4. Bladé J., Samson D., Reece D., Apperley J., Björkstrand B., Gahrton G., Gertz M., Giral S., Jagannath S., Vesole D. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant // Br. J. Haematol. 1998. Vol. 102 (5). P. 1115–1123.
5. Chen H.S., Liu E.B., Wang T.T., Yang R.C., Fang L.H., Yang Q.Y., Gao J.Y., Yu M.H., Qian L.S. Morphologic and clinical study of 131 cases of plasma cell myeloma // Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 2004. Vol. 33 (1). P. 44–48.
6. Durie B.G., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival // Cancer. 1975. Vol. 36 (3). P. 842–854.
7. Huang Y.W., Hamilton A., Arnuk O.J., Chafitari P., Chemaly R. Current drug therapy for multiple myeloma // Drugs. 1999. Vol. 57 (4). P. 485–506.
8. Kyle R.A., Rajkumar S.V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma // Leukemia. 2009. № 23. P. 3–9. doi: 10.1038/leu.2008.291.
9. Singhal N., Singh T., Singh Z.N., Shome D.K., Gaiha M. Histomorphology of multiple myeloma on bone marrow biopsy // Indian J. Pathol. Microbiol. 2004. Vol. 47 (3). P. 359–363.
10. Subramanian R., Basu D., Dutta T.K. Significance of bone marrow fibrosis in multiple myeloma // Pathology. 2007. Vol. 39 (5). P. 512–515.
11. Tadmor T., Shvidel L., Aviv A., Ruchlemer R., Bairey O., Yulek M., Herishanu Y., Braester A., Rahimi-Levene N., Verne A.,

Ben-Ezra J., Bejar J., Polliack A. Significance of bone marrow reticulin fibrosis in chronic lymphocytic leukemia at diagnosis // *Cancer*. 2013. Vol. 119 (10). P. 1853–1859. doi: 10.1002/cncr.27930.

12. Thiele J., Kvasnicka H.M., Facchetti F., Franco V., van der Walt J., Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity // *Haematologica*. 2005. Vol. 90. P. 1128–1132.

Поступила 13.03.14

REFERENCES

1. *Russian Clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of lymphoproliferative diseases* / Ed. I.V. Poddubnaya, V.G. Savchenko. M.: Media Medika, 2013. 104 p. [in Russian]

2. Abildgaard N., Bendix-Hansen K., Kristensen J.E., Vejlgard T., Risteli L., Nielsen J.L., Heickendorff L. Bone marrow fibrosis and disease activity in multiple myeloma monitored by the aminoterminal propeptide of procollagen III in serum // *Br. J. Haematol.* 1997. Vol. 99 (3). P. 641–648.

3. Babarović E., Valković T., Štifter S., Budisavljević I., Seili-Bekafigo I., Duletić-Načinović A., Lučin K., Jonjić N. Assessment of bone marrow fibrosis and angiogenesis in monitoring patients with multiple myeloma // *Am. J. Clin. Pathol.* 2012. 137 (6): 870–8. doi: 10.1309/AJCP15Y2JRI-UUCUB.

4. Bladé J., Samson D., Reece D., Apperley J., Björkstrand B., Gahrton G., Gertz M., Giralt S., Jagannath S., Vesole D. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant // *Br. J. Haematol.* 1998. Vol. 102 (5). P. 1115–1123.

5. Chen H.S., Liu E.B., Wang T.T., Yang R.C., Fang L.H., Yang Q.Y., Gao J.Y., Yu M.H., Qian L.S. Morphologic and clinical study of 131 cases of plasma cell myeloma // *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2004. Vol. 33 (1). P. 44–48.

6. Durie B.G., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival // *Cancer*. 1975. Vol. 36 (3). P. 842–854.

7. Huang Y.W., Hamilton A., Arnuik O.J., Chafari P., Chemaly R. Current drug therapy for multiple myeloma // *Drugs*. 1999. Vol. 57 (4). P. 485–506.

8. Kyle R.A., Rajkumar S.V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma // *Leukemia*. 2009. № 23. P. 3–9. doi: 10.1038/leu.2008.291.

9. Singhal N., Singh T., Singh Z.N., Shome D.K., Gaiha M. Histomorphology of multiple myeloma on bone marrow biopsy // *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2004. Vol. 47 (3). P. 359–363.

10. Subramanian R., Basu D., Dutta TK. Significance of bone marrow fibrosis in multiple myeloma // *Pathology*. 2007. Vol. 39 (5). P. 512–515.

11. Tadmor T., Shvidel L., Aviv A., Ruchlemer R., Bairey O., Yuklea M., Herishanu Y., Braester A., Rahimi-Levene N., Vernea F., Ben-Ezra J., Bejar J., Polliack A. Significance of bone marrow reticulin fibrosis in chronic lymphocytic leukemia at diagnosis // *Cancer*. 2013. Vol. 119 (10). P. 1853–1859. doi: 10.1002/cncr.27930.

12. Thiele J., Kvasnicka H.M., Facchetti F., Franco V., van der Walt J., Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity // *Haematologica*. 2005. Vol. 90. P. 1128–1132.

РОЛЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРОЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНОВ АЛЬФА В РАЗВИТИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ЭНДОКРИНОТЕРАПИИ ТАМОКСИФЕНОМ У ПАЦИЕНТОК С ЛЮМИНАЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.М. Слонимская^{1,2}, С.В. Вторушин^{1,2}, Н.Н. Бабышкина^{1,3}, С.В. Паталяк¹

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»

Минздравсоцразвития России, г. Томск²

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск³

634050 г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: Patalyak@gmail.com¹

Основным системным компонентом лечения люминального рака молочной железы является гормонотерапия, базисным препаратом которой является тамоксифен. Гормонотерапия оказывается неэффективной в 20–40 %, при этом в качестве возможных причин рассматриваются особенности распределения и строения рецепторов эстрогенов альфа (ERα) в ткани опухоли. Реализация терапевтического действия тамоксифена осуществляется посредством блокирования активационного центра AF-2 рецептора, изменение функционального состояния которого в результате однонуклеотидных полиморфизмов кодирующего его участка rs2228480 (G/A) в 8 экзоне гена ERα рассматривается в качестве возможной причины неэффективности терапии тамоксифеном.

Цель исследования: изучение взаимосвязи экспрессии рецепторов эстрогенов альфа и полиморфных вариантов 8 экзона гена ERα с эффективностью антиэстрогенной терапии тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы.

Материал и методы: в исследование были включены 97 пациенток с люминальным раком молочной железы T₁₋₂N₀₋₁M₀ стадии, получавшие адъювантную терапию тамоксифеном, сроки наблюдения составили от 24 до 130 мес. Отдаленные результаты лечения оценивались по факту прогрессирования заболевания в виде появления отдаленных метастазов. В образцах опухолевой ткани изучалась экспрессия к ERα иммуногистохимическим методом (антитела «Dako», клон 1D5, RTU, мышиные). Оценивались показатели степени и интенсивности экспрессии, а также характер распределения ERα. Изучались полиморфные варианты 8 экзона гена рецептора с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Результаты: при гомогенном распределении рецепторов степень и интенсивность экспрессии оказалась значимо выше. У пациенток с прогрессированием заболевания гетерогенное распределение наблюдалось в 86,5 %, при благоприятном исходе – в 58,3 % случаев (p=0,0072; $\chi^2=7,22$). Мутация rs2228480 (G/A) в 8 экзоне гена ERα выявлена в 19,4 %, при этом в клетках опухоли с гомогенным распределением рецепторов случаев мутации не отмечено, при гетерогенном распределении мутации выявлены в 25,7 % (p=0,014; $\chi^2=6,09$). Показано, что мутация в 8 экзоне гена ERα значимо чаще встречается у пациенток с прогрессированием заболевания (p=0,01; $\chi^2=6,52$).

Выводы: характер распределения рецепторов эстрогенов альфа и наличие мутации в 8 экзоне гена ERα в ткани опухоли можно рассматривать наряду со стандартными параметрами в качестве дополнительных предсказательных критериев эффективности антиэстрогенной терапии тамоксифеном у пациенток с люминальным типом рака молочной железы.

Ключевые слова: люминальный тип рака молочной железы, резистентность к гормонотерапии, ультраструктура рецепторов эстрогенов.

ROLE OF MORPHOLOGICAL AND GENETIC STRUCTURAL CHARACTERISTICS OF ESTROGEN RECEPTOR ALPHA IN THE DEVELOPMENT OF RESISTANCE TO ENDOCRINOTHERAPY WITH TAMOXIFEN IN PATIENTS WITH LUMINAL BREAST CANCER

E.M. Slonimskaya^{1,2}, S.V. Vtorushin^{1,2}, N.N. Babyshkina^{1,3}, S.V. Patalyak¹Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk¹Siberian State Medical University, Tomsk²National Research Tomsk State University, Tomsk³5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia, e-mail: Patalyak@gmail.com¹

Hormone therapy with tamoxifen is the commonly used treatment for luminal breast cancer. However, it appears to be ineffective in 20–40 % of cases and the possible reasons of this failure are related to the features of distribution and structure of estrogen receptor alpha (ER α) in tumor tissue. Realization of the therapeutic effect of tamoxifen is carried out by blocking the activation center of AF-2 receptor. The change in the functional state of this receptor resulted from single-nucleotide polymorphisms coding 2228480 (G/A) in exon 8 of ER α gene is considered as a possible cause of treatment failure with tamoxifen.

The purpose of the study was to analyze the relationship between the ER α expression and polymorphic variants in exon 8 of the ER α gene and the efficacy of tamoxifen in patients with luminal breast cancer.

Material and methods: The study included 97 patients with stage T₁₋₂N₀₋₁M₀ luminal breast cancer, who received adjuvant chemotherapy with tamoxifen. The follow-up ranged from 24 to 130 months. Long-term treatment outcomes were assessed upon the progression of the disease with the evidence of distant metastases. In tumor tissue samples, the ER α expression was studied using the immunohistochemical method. The values of the ER α expression intensity as well as the character of ER α distribution were assessed. Polymorphic variants of exon 8 of the ER α gene were studied using real-time PCR.

Results. The heterogeneous distribution of ER α gene was observed in 86.5 % cases with diseases progression and in 58.3 % of cases with favorable disease outcome ($p=0.0072$; $\chi^2=7.22$). Mutation of rs2228480 (G/A) in exon 8 of the ER α gene was observed in 19.4 % of cases. Mutations were not noted in tumor cells with homogenous distribution of the ER α gene and mutations were found in 25.7 % ($p=0.014$; $\chi^2=6.09$) in heterogeneous distribution. Mutation in exon 8 of the ER α gene was shown to occur more often in patients with disease progression ($p=0.01$; $\chi^2=6.52$).

Conclusion: The character of the ER α gene distribution and the presence of mutation in exon 8 of the ER α gene in tumor tissue can be considered as additional predictive factors of response to therapy with tamoxifen in patients with luminal breast cancer.

Key words: luminal breast cancer, resistance to hormone therapy, structure of estrogen receptors.

Рак молочной железы (РМЖ) – гетерогенная группа опухолей. Согласно молекулярно-генетической классификации, предложенной С.М. Perou et al. [13], одним из определяющих критериев разделения РМЖ на подтипы является наличие в опухолевой ткани рецепторов к эстрогену и прогестерону. Опухоли, экспрессирующие рецепторы, относятся к люминальным и составляют 70–80 % всех случаев РМЖ [12, 13]. Основным компонентом адъювантного лечения люминального рака молочной железы является антиэстрогенная терапия, базисным препаратом которой остается тамоксифен [6, 14].

Считается, что главным предсказательным критерием эффективности эндокринной терапии является сам факт наличия рецепторов эстрогенов альфа (ER α) в ткани опухоли. В качестве дополнительных рассматриваются степень экспрессии ER α (доля опухолевых клеток, имеющих рецепторы) и интенсивность их окрашивания. Установлено, что высокие

значения этих показателей ассоциированы с лучшей эффективностью лечения [5]. При стандартной оценке рецепторного статуса, как правило, не учитывается такой параметр, как характер распределения рецепторов эстрогенов альфа в ткани опухоли. Тем не менее показано, что гетерогенное распределение рецепторов ассоциировано с неблагоприятным исходом заболевания – высокой вероятностью лимфогенного и гематогенного метастазирования [1]. Однако предсказательная значимость этого параметра не изучалась.

Несмотря на относительно благоприятный клинический прогноз при люминальном типе РМЖ, по данным литературы, у 10–20 % больных на фоне проведения адъювантной гормонотерапии тамоксифеном отмечается прогрессирование заболевания уже в первые 12 мес от начала лечения, а в последующие годы этот показатель увеличивается до 20–40 % [5, 12, 15]. Изучение причин неэффективности терапии

тамоксифеном развивается по двум направлениям. В качестве первого рассматривают реализацию различных путей активации рецепторов эстрогенов. Классический геномный путь активации осуществляется посредством взаимодействия эстрадиола с активационным центром AF-2 (activating functions – AF-2) рецептора. На эту же мишень воздействует и тамоксифен, являясь конкурентным антагонистом эстрадиола [8]. Реализация неклассического геномного пути активации рецепторов эстрогенов альфа (ER α) происходит под воздействием ряда ростовых факторов (IGF-1, EGFR, Her-2/neu, TGF- β), способных активировать домен AF-1 ER α , который не блокируется тамоксифеном, что также может обуславливать неэффективность гормонотерапии [12, 15].

В качестве второй возможной причины резистентности к терапии тамоксифеном обсуждается наличие изменений ультраструктуры самих рецепторов эстрогенов в результате однонуклеотидных полиморфизмов. Установлены области транскрипции гена рецепторов эстрогенов, ответственные за строение активационных центров AF-1 и AF-2 [4, 11]. Так, наличие полиморфизма rs2077647 (C/T) в первом экзоне гена ER α , который локализуется в A/B домене, ассоциировано со структурными изменениями функциональной области транскрипционной активации центра AF-1. Полиморфизм же rs2228480 (G/A) (594Thr) в 8 экзоне, располагающемся в E/F регионе, соответствует лиганд-зависимой функциональной области транскрипции центра AF-2. Структурные изменения в активационных центрах могут приводить к нарушению функции самих рецепторов. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что мутации в 8 экзоне гена ER α делают невозможным связывание тамоксифена с центром AF-2, тем самым обуславливая его неэффективность и, следовательно, нецелесообразность проводимой антиэстрогенной терапии [4]. Однако эти работы немногочисленны и в большей степени носят поисковый характер, что определяет целесообразность изучения обозначенной проблемы.

Целью исследования явилось изучение взаимосвязи экспрессии рецепторов эстрогенов альфа и полиморфных вариантов гена ER α с эффективностью антиэстрогенной терапии тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы.

Материал и методы

В исследование были включены 97 пациенток с люминальным раком молочной железы T₁₋₂N₀₋₁M₀ стадии, средний возраст – 54,35 ± 0,87 года. В состоянии менопаузы лет находились 55 больных, у 42 менструальный цикл был сохранен. Во всех наблюдениях опухоли были представлены инвазивной протоковой карциномой. Пациентки получили комбинированное лечение в виде оперативного вмешательства в объеме радикальной мастэктомии или радикальной резекции. По показаниям проводилась послеоперационная лучевая терапия и/или адъювантная химиотерапия (по схеме FAC). Обязательным компонентом адъювантной терапии явился прием тамоксифена в стандартной дозировке (20 мг/сут). Сроки наблюдения за больными составили от 24 до 130 мес.

Отдаленные результаты лечения оценивались по факту прогрессирования заболевания в виде появления отдаленных метастазов. В зависимости от этого были сформированы 2 группы пациентов: без признаков прогрессирования (n=60) и с прогрессированием заболевания (n=37). Группы были сопоставимы по основным клинико-морфологическим параметрам и объему проведенного лечения.

Исследовались образцы опухолевой ткани. Подготовка материала и патоморфологическое исследование осуществлялись по стандартной методике. Экспрессию к рецепторам эстрогенов альфа изучали иммуногистохимическим методом, применяли антитела фирмы «Dako» (клон 1D5, RTU, мышиные). Оценка экспрессии к рецепторам эстрогенов альфа проводилась количественным методом гисто-счета (Histo-Score). При этом определялась степень экспрессии (доля позитивных клеток) и её интенсивность (показатель экспрессии в баллах). Дополнительно оценивался характер распределения рецепторов в опухолевой ткани [2]. Если отмечалось равномерное распределение рецепторов, независимо от интенсивности окрашивания экспрессию расценивали как гомогенную. При наличии участков с позитивной и негативной экспрессией, а также с различной степенью выраженности – экспрессию рассматривали как гетерогенную.

Для оценки ультраструктуры ER α проводилось выделение ДНК из опухолевых образцов путем депарафинизации срезов с помощью наборов Qiaamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen). Качественный и

количественный анализ ДНК проведен на спектрофотометре NanoDrop-1000 («NanoDrop», США). Изучение полиморфных вариантов в 8 экзоне гена рецептора выполнено с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Последовательность праймеров и проб подбирали при помощи программы OligoAnalysisVector NTI с использованием генетического банка данных (www.ncbi.nlm.nih.gov). Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл включала 100 нг геномной ДНК; 0,5–1,5 мкл специфической пары праймеров и проб с концентрацией 1 о.е./мл; 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата; 1,2–2,0 мкл буфера (60 мМ Tris-HCl (pH 8,5 при 25°C), 1,5 мМ MgCl₂; 25 мМ KCl; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 0,1 % Тритон X-100) и 0,5–1,0 ед. Taq ДНК-полимеразы («Медиген», Новосибирск). Программа амплификации предполагала предварительную денатурацию

при 95°C в течение 2 мин, с последующими 40 циклами денатурации при 95°C (10 сек), отжига при специфической температуре для каждой пары праймеров (30 сек) на амплификаторе ICycler IQ5 («Bio-Rad», США).

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан (Указ Президента РФ № 2288, от 24.12.93), на основании разрешения локального комитета по биомедицинской этике ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «STATISTICA 8».

Результаты исследования и обсуждение

На первом этапе исследования были проанализированы стандартные показатели рецепторного статуса. Оценивалась связь степени и интенсив-

Таблица 1

Взаимосвязь интенсивности экспрессии ERα с исходом заболевания

Показатели	Больные РМЖ без прогрессирования (n=38)	Больные РМЖ с прогрессированием (n=29)	p
Степень экспрессии	74,55 ± 3,72 %	68,97 ± 5,22 %	0,016
Интенсивность экспрессии, Ед.	140,83 ± 12,26	117 ± 17,4	0,031

Таблица 2

Связь характера распределения ERα с частотой отдаленного метастазирования

Характер распределения ERα	Больные РМЖ без прогрессирования (n=60)	Больные РМЖ с прогрессированием (n=37)
Гетерогенный	35 (58,3 %)	32 (86,5 %)
Гомогенный	25 (41,7 %)	5 (13,5 %)
p=0,03; $\chi^2=4,38$		

Таблица 3

Соотносимость свойств рецепторов ERα с частотой отдаленного метастазирования

Характеристики опухоли	Больные РМЖ без прогрессирования (n=45)	Больные РМЖ с прогрессированием (n=26)
«Благоприятные»	25	5
«Неблагоприятные»	20	21
p=0,006; $\chi^2=7,48$		

Таблица 4

Распределение аллелей 8 экзона гена ERα в зависимости от исхода заболевания

Генотип 8 экзона гена ERα	Больные РМЖ без прогрессирования (n=45)	Больные РМЖ с прогрессированием (n=26)
Дикий аллель (G)	49*	30
Мутантный аллель (A)	5	14
p=0,01; $\chi^2=6,52$		

ности экспрессии рецепторов эстрогенов альфа в ткани опухоли с исходом заболевания (табл. 1). Установлено, что в группе пациентов без признаков прогрессирования заболевания степень и интенсивность экспрессии ER α были значимо выше. Эти данные согласуются с результатами, ранее полученными другими авторами [5, 7, 9].

При изучении интенсивности экспрессии рецепторов в зависимости от характера их распределения оказалось, что при гомогенном распределении средняя интенсивность экспрессии составила $208 \pm 10,54$, тогда как при гетерогенном она была существенно ниже – $98,66 \pm 9,4$. Различия статистически значимы ($p=0,0003$). При оценке связи характера распределения рецепторов эстрогенов альфа в ткани опухоли с отдаленными результатами лечения установлено, что у пациенток с прогрессированием заболевания гетерогенное распределение отмечено в 86,5 % (табл. 2), в то время как при благоприятном исходе оно наблюдалось в 58,3 % случаев ($p=0,0072$; $\chi^2=7,22$). Полученные результаты позволяют полагать, что такой морфологический параметр, как характер распределения рецепторов эстрогенов альфа в ткани опухоли больных РМЖ, определенным образом сопряжен с эффективностью антиэстрогенной терапии тамоксифеном. В литературе представлены данные, свидетельствующие лишь об ассоциации гетерогенного распределения ER α с неблагоприятным исходом заболевания (высокой вероятностью лимфогенного и гематогенного метастазирования) [1]. Предсказательная значимость этого параметра ранее не оценивалась.

Учитывая высокую сопряженность уровня экспрессии ER α и характера их распределения с отдаленными результатами лечения, был проведен анализ совместного использования этих показателей. К условно благоприятным отнесены опухоли, в которых степень экспрессии ER α была ≥ 70 % в сочетании с гомогенным характером распределения рецепторов ($n=30$), к неблагоприятным – при наличии в новообразовании степени экспрессии рецепторов <70 % с гетерогенным характером распределения ($n=41$). Оказалось, что при одновременном сочетании таких неблагоприятных характеристик опухоли, как низкая экспрессия ER α и их гетерогенное распределение достоверно чаще наблюдается прогрессирование заболевания (табл. 3, $p=0,006$; $\chi^2=7,48$).

При оценке наличия полиморфизма rs2228480 (G/A) в 8 экзоне гена ER α в образцах опухолевой ткани, полученных от 49 пациентов, он был выявлен в 19,4 %. Интересно отметить, что у больных, в опухолевых клетках которых определялась гомогенная окраска рецепторов, случаев мутации отмечено не было, в то время как при гетерогенном их распределении мутации 8 экзона были определены в 25,7 % наблюдений ($p=0,014$; $\chi^2=6,09$). Наличие данной мутации было соотнесено с прогрессированием заболевания. У больных с неблагоприятным исходом частота встречаемости мутантного аллеля (A) в ткани опухоли оказалась достоверно выше (табл. 4, $p=0,01$; $\chi^2=6,52$).

Наличие мутации в 8 экзоне гена ER α рассматривается в литературе в качестве неблагоприятного прогностического фактора для РМЖ [10, 11]. Так, S. Abbas et al. изучали однонуклеотидные полиморфизмы в областях rs2077647 (1 экзон), rs1801132, rs2228480 (8 экзон) в гене ER α и кодона 392 в гене ER β . Было показано, что у женщин с ранним менархе (до 12 лет) и наличием полиморфизмов во всех трех участках гена рецепторов эстрогенов альфа риск развития рака молочной железы составляет 60,4 % ($p=0,001$), а у пациенток с установленным диагнозом РМЖ было отмечено более частое поражение регионарных лимфатических узлов ($p=0,033$) [3].

Заключение

Полученные результаты позволяют полагать, что такие показатели, как характер распределения рецепторов эстрогенов альфа и наличие мутации в 8 экзоне гена ER α в ткани опухоли, наряду со стандартными параметрами (степень и интенсивность экспрессии рецепторов), можно рассматривать в качестве дополнительных предсказательных критериев эффективности антиэстрогенной терапии тамоксифеном у пациенток с люминальным типом рака молочной железы. Определение этих показателей в биопсийном или операционном материале может позволить индивидуализировать целесообразность назначения тамоксифена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Гарбуков Е.Ю., Кокорина Ю.Л., Дорошенко А.В., Красулина Н.А. Прогнозирование лимфогенного метастазирования и исход заболевания у больных раком молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы: Маммология. 2007. № 1. С. 43–45.
2. Патент 2300111 РФ. Способ прогнозирования течения заболевания раком молочной железы / Вторушин С.В., Перельмутер

В.М., Крицкая Н.Г., Слонимская Е.М., Завьялова М.В.; опубли. 27.05.07.

3. Abbasi S., Nouri M., Azimi C. Estrogen receptor genes variations and breast cancer risk in Iran // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2012. Vol. 5 (4). P. 332–341.

4. Anghel A., Raica M., Narita D., Seclaman E., Nicola T., Ursoniu S., Anghel M., Popovici E. Estrogen receptor alpha polymorphisms: correlation with clinicopathological parameters in breast cancer // *Neoplasma*. 2010. Vol. 57. P. 306–315.

5. Burstein H.J., Anderson H., Buchholz T.A., Davidson N.E., Gelmon K.E., Giordano S.H., Hudis C.A., Malin J., Mamounas E.P., Rowden D., Solky A.J., Sowers M.R., Stearns V., Winer E.P., Somerfield M.R., Griggs J.J. American society of clinical oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer // *J. Clin. Oncol.* 2010. Vol. 28 (23). P. 3784–3796. doi: 10.1200/JCO.2009.26.3756.

6. Duffy S., Jackson T.L., Lansdown M., Philips K., Wells M., Pollard S., Clack G., Coibion M., Bianco A.R. Retrospective Analysis of Time to Recurrence in the ATAC Trial According to Hormone Receptor Status: An Hypothesis-Generating Study // *Hum. Reprod.* 2006. Vol. 21 (2). P. 545–553.

7. Fisher B., Redmond C., Brown A. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer // *J. Clin. Oncol.* 1983. Vol. 1 (4). P. 227–241.

8. Glaros S., Atanaskova N., Zhao C., Skafar D.F., Reddy K.B. Activation function-1 domain of estrogen receptor regulates the agonistic and antagonistic actions of tamoxifen // *J. Mol. Endocrinol.* 2006. Vol. 20 (5). P. 996–1008.

9. Johnston S. R. D., Saccani-Jotti G., Smith I.E. Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer // *Cancer Res.* 1995. Vol. 55. P. 3331–3338.

10. Long J.R., Xu H., Zhao L.J. The oestrogen receptor a gene is linked and/or associated with age of menarche in different ethnic groups // *J. Med. Genet.* 2005. Vol. 42. P. 796–800.

11. Mascres B., Mark M., Krezel W. Differential contributions of AF-1 and AF-2 activities to the developmental functions of RXRa // *Development*. 2001. Vol. 128. P. 2049–2062.

12. Massarweh S., Osborne C. K., Creighton C.J., Qin L., Tsimelzon A., Huang S., Weiss H., Rimawi M., Schiff R. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68 (3). P. 826–833. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2707.

13. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. Molecular portraits of human breast tumours // *Nature*. 2000. Vol. 406 (6797). P. 747–752.

14. Pusztai L., Mazouni C., Anderson K., Wu Y., Symmans F.W. Molecular Classification of Breast Cancer: Limitations and Potential // *The Oncologist*. 2006. Vol. 11. P. 868–877.

15. Ring A., Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance // *Endocr. Relat. Cancer*. 2004. Vol. 11. P. 643–658.

Поступила 30.04.14

REFERENCES

1. Vtorushin S.V., Slonimskaya E.M., Perelmutter V.M., Zaviyalova M.V., Garbukov E.Yu., Kokorina Yu.L., Doroshenko A.V., Krasulina N.A. The prediction of lymphatic cancer spread and the outcome of the disease in patients with breast cancer // *Opuholi zhenskoy reproduktivnoy sistem: Mammologiya*. 2007. Vol. 1. P. 43–45.

2. Patent No 2300111 Russia. The prediction of outcome of the disease in patients with breast cancer / Vtorushin S.V., Perel'muter V.M., Krickaja N.G., Slonimskaja E.M., Zav'jalova M.V. 27.05.07.

3. Abbasi S., Nouri M., Azimi C. Estrogen receptor genes variations and breast cancer risk in Iran // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2012. Vol. 5 (4). P. 332–341.

4. Anghel A., Raica M., Narita D., Seclaman E., Nicola T., Ursoniu S., Anghel M., Popovici E. Estrogen receptor alpha polymorphisms: correlation with clinicopathological parameters in breast cancer // *Neoplasma*. 2010. Vol. 57. P. 306–315.

5. Burstein H.J., Anderson H., Buchholz T.A., Davidson N.E., Gelmon K.E., Giordano S.H., Hudis C.A., Malin J., Mamounas E.P., Rowden D., Solky A.J., Sowers M.R., Stearns V., Winer E.P., Somerfield M.R., Griggs J.J. American society of clinical oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer // *J. Clin. Oncol.* 2010. Vol. 28 (23). P. 3784–3796. doi: 10.1200/JCO.2009.26.3756.

6. Duffy S., Jackson T.L., Lansdown M., Philips K., Wells M., Pollard S., Clack G., Coibion M., Bianco A.R. Retrospective Analysis of Time to Recurrence in the ATAC Trial According to Hormone Receptor Status: An Hypothesis-Generating Study // *Hum. Reprod.* 2006. Vol. 21 (2). P. 545–553.

7. Fisher B., Redmond C., Brown A. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer // *J. Clin. Oncol.* 1983. Vol. 1 (4). P. 227–241.

8. Glaros S., Atanaskova N., Zhao C., Skafar D.F., Reddy K.B. Activation function-1 domain of estrogen receptor regulates the agonistic and antagonistic actions of tamoxifen // *J. Mol. Endocrinol.* 2006. Vol. 20 (5). P. 996–1008.

9. Johnston S. R. D., Saccani-Jotti G., Smith I.E. Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer // *Cancer Res.* 1995. Vol. 55. P. 3331–3338.

10. Long J.R., Xu H., Zhao L.J. The oestrogen receptor a gene is linked and/or associated with age of menarche in different ethnic groups // *J. Med. Genet.* 2005. Vol. 42. P. 796–800.

11. Mascres B., Mark M., Krezel W. Differential contributions of AF-1 and AF-2 activities to the developmental functions of RXRa // *Development*. 2001. Vol. 128. P. 2049–2062.

12. Massarweh S., Osborne C. K., Creighton C.J., Qin L., Tsimelzon A., Huang S., Weiss H., Rimawi M., Schiff R. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68 (3). P. 826–833. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2707.

13. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. Molecular portraits of human breast tumours // *Nature*. 2000. Vol. 406 (6797). P. 747–752.

14. Pusztai L., Mazouni C., Anderson K., Wu Y., Symmans F.W. Molecular Classification of Breast Cancer: Limitations and Potential // *The Oncologist*. 2006. Vol. 11. P. 868–877.

15. Ring A., Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance // *Endocr. Relat. Cancer*. 2004. Vol. 11. P. 643–658.

ОЦЕНКА ВНЕКЛЕТОЧНОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПРОТЕОЛИЗА ПРИ ПРЕДОПУХОЛЕВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ГОРТАНИ

**И.В. Кондакова, Г.В. Какурина, Л.В. Спирина, О.В. Черемисина, О.В. Панкова,
К.Ю. Меньшиков**

*ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск
634050, Россия, г. Томск, пер. Кооперативный, 5,
e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru*

Проведено исследование экспрессии генов матричных металлопротеиназ, активности протеасом и кальпаинов при предопухолевых и опухолевых заболеваниях гортани. Показано достоверное увеличение экспрессии генов ММП-1 и ММП-14 при сравнении диспластически измененного эпителия с опухолевой тканью рака гортани. Кроме того, обнаружено, что активность протеасом и кальпаинов в ткани опухоли гортани были достоверно выше по сравнению с таковыми в ткани при дисплазии слизистой оболочки гортани. Полученные результаты свидетельствуют о том, что внеклеточные и внутриклеточные протеазы играют важную роль в развитии рака гортани. Выявленные особенности патогенеза диспластических процессов и рака гортани в дальнейшем позволят выделить дополнительные объективные критерии, которые позволят прогнозировать риск развития злокачественного новообразования.

Ключевые слова: матричные металлопротеиназы, протеасомы, кальпаины, дисплазия, рак гортани.

ASSESSMENT OF EXTRACELLULAR AND INTRACELLULAR PROTEOLYSIS IN PRETUMOR AND TUMOR DISEASES OF THE LARYNX

*I.V. Kondakova, G.V. Kakurina, L.V. Spirina, O.V. Cheremisina, O.V. Pankova, K.Yu. Menshikov
Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk
5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia,
e-mail: kondakova@oncology.tomsk.ru*

The expression of matrix metalloproteinase (MMP) genes and activity of proteasomes and calpains were studied in patients with precancerous laryngeal lesions and laryngeal cancer. A significant increase in MMP-1 and MMP-14 gene expression was shown in laryngeal cancer tissue compared to that observed in dysplastic laryngeal tissue. Furthermore, the activity of proteasomes and calpains was significantly higher in laryngeal cancer tissue than in dysplastic laryngeal tissue. The results obtained indicate that extracellular and intracellular proteases play an important role in the development of laryngeal cancer. The detected features of pathogenesis of laryngeal dysplasia and laryngeal cancer will allow the additional objective criteria for predicting the risk for malignancy to be identified.

Key words: matrix metalloproteinase, proteasomes, calpains, dysplasia, laryngeal cancer.

Рак гортани (РГ) продолжает занимать лидирующие позиции среди злокачественных опухолей верхних дыхательных путей, составляя 65–70 %. В общей структуре онкологической заболеваемости на РГ приходится 1,4 %. В 2012 г. в России зарегистрирован 6 601 первичный случай рака гортани. Несмотря на доступность органа для визуального и инструментального исследования, эта опухоль по-прежнему редко выявляется на ранних стадиях. На долю РГ I стадии пришлось 10,6 % впервые выявленных случаев заболевания, тогда как распространенный процесс – рак гортани III и IV

стадий – был выявлен у 46,8 % и 17 % больных соответственно [9].

Эпидемиологические исследования, проведенные в различных странах, показали, что практически в 60 % случаев РГ развивается на основе различных хронических заболеваний, составляющих группу облигатного предрака: хронический гиперпластический ларингит (ХГЛ) и папилломатоз гортани (ПГ), дискератоз [8, 12]. Частота ХГЛ в популяции варьирует в пределах 30–65 %, а вероятность малигнизации данного заболевания в сроки от 6 мес до 7 лет с момента установки

диагноза составляет 60–65 %. При папилломатозе злокачественное перерождение возможно у 8–20 % больных, обычно оно реализуется в течение 10 и более лет [1, 7].

В настоящее время наличия очагов дисплазии в эпителии гортани недостаточно для включения пациента в группу онкологического риска, поскольку неоднородность диспластических изменений внутри подгруппы не позволяет адекватно определить сроки динамического наблюдения и методы лечения – необходимы дополнительные более определенные критерии прогноза развития предраковых изменений [22]. В литературе активно обсуждается возможность использования определения матриксных металлопротеаз (ММП), которые являются внеклеточными протеазами и участвуют практически во всех этапах опухолевой прогрессии [2, 4, 11, 14, 15]. Показана важность определения ММП и их тканевых ингибиторов в качестве потенциальных прогностических маркеров [3, 17, 21]. Кроме того, в развитии плоскоклеточного рака области головы и шеи важную роль играют внутриклеточные протеазы, такие как протеасомы и кальпаины [9, 10, 13, 16]. Однако отсутствуют публикации о роли ММП, протеасом и кальпаинов при злокачественной трансформации в слизистой оболочке гортани, а также о практическом использовании их определения для выявления больных с диспластическими процессами с высоким онкологическим риском по РГ.

В связи с этим **целью исследования** было изучение экспрессии генов матриксных металлопротеиназ, активности протеасом и кальпаинов при предопухолевых и опухолевых заболеваниях гортани.

Материал и методы

В работе представлены результаты исследования 51 больного раком гортани (стадии $T_{1-4}N_{0-3}M_0$) в возрасте от 31 до 77 лет и 12 человек с предопухолевыми заболеваниями гортани (ХГЛ и папилломатоз) в возрасте от 38 до 69 лет, находившихся на обследовании и лечении в ФГБУ «НИИ онкологии» г. Томска. Исследование проходило с разрешения локального этического комитета института, было получено информированное согласие пациентов. Группы больных были сопоставимы по полу, возрасту и сопутствующим заболеваниям. Во всех случаях опухоли имели гистологическое строение плоскоклеточного рака различной степени диффе-

ренцировки. Все больных раком гортани до начала исследования не получали специального лечения.

При выполнении видеоларингоскопии проводился забор материала из участков опухоли и неизменной слизистой оболочки на расстоянии примерно 2 см от границы опухоли для комплексного морфологического исследования с целью верификации диагноза и для исследования экспрессии генов ММП, химотрипсинподобной активности протеасом и активности кальпаинов. Для подтверждения отсутствия патологических изменений в данных участках выполнялись мазки-отпечатки. У пациентов с предопухолевыми заболеваниями забор материала осуществлялся из измененных участков, а также из нормальной слизистой на расстоянии примерно 2 см от патологического процесса. Биопсийный материал замораживали в жидком азоте, перевозили и хранили при температуре -80°C .

Выделение суммарной клеточной РНК проводили с помощью набора Illustra RNeasy Mini Kit (GE Healthcare). Затем РНК очищали от примеси ДНК с помощью ДНКазы. Для оценки качества суммарную клеточную РНК анализировали электрофорезом в 1,5 % агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл этидия бромид. Качество и количество РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 1000, соотношение A_{260}/A_{280} составляло не менее 1,8–2,0.

Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции РНК в присутствии 0,5 мкг универсального праймера oligo(dT)16 и M-MuLV обратной транскриптазы (Биосан, Новосибирск). Для контроля прохождения реакции обратной транскрипции с полученным продуктом и неретвертированной РНК проводили ПЦР с праймерами, специфичными к последовательности гена GAPDH.

Для анализа уровня экспрессии генов ММП-1, -2, -9, -14 использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР) с праймерами производства фирмы Sintol (Москва) [6]. Реакционная смесь для проведения ПЦР-реакции содержала дНТФ 2,5 мМ, 10хПЦР-буфер, MgCl_2 25 мМ, смесь праймеров 10 пкмоль/мкл, флуоресцентный зонд 10 пкмоль/мкл, Tag-ДНК-полимеразу 5 Е/мкл, образец кДНК, деионизированную воду. Реакцию проводили на амплификаторе Rotor-gene 6000 (Австралия). Результаты выражали в услов-

ных единицах (уровень экспрессии изучаемых генов по отношению к уровню экспрессии гена домашнего хозяйства). В качестве эндогенного внутреннего контроля, относительно которого проводили нормализацию продуктов амплификации исследуемых генов, был выбран ген «домашнего хозяйства» GAPDH. Изменение уровня количества мРНК в образце опухолевой ткани по отношению к неизменной ткани вычисляли по формуле: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [18].

Определение химотрипсинподобной активности протеасом и активности кальпаинов проводили в осветленных гомогенатах, для чего замороженную ткань (100 мг) гомогенизировали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 mM трис-HCl буфера (pH=7,5), содержащего 2 mM АТФ, 5 mM хлорида магния, 1 mM дитиотреитола, 1 mM ЭДТА и 100 mM хлорида натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000g и 4°C. Химотрипсинподобную активность протеасом определяли по гидролизу флуорогенного олигопептида N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin (Sigma, США), утилизирующегося химотрипсинподобными центрами протеасом, на флуориметре Hitachi-850 (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм (Ben-Shahar S., 1999). Для оценки активности примесных протеаз в образцах применяли специфический ингибитор протеасом – MG132. За единицу активности протеасом принимали количество фермента, при котором гидролизует 1 нмоль Suc-LLVY-AMC в течение 1 мин. Удельную активность протеасом выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Активность кальпаинов определяли в осветленных гомогенатах тканей по гидролизу флуорогенного олигопептида Suc-LLVY-AMC [19]. Реакцию проводили, добавляя к 30 μ M Suc-LLVY-AMC (Sigma, США), растворенному в реакционной смеси, 5 μ l супернатанта и инкубируя при 25°C в течение 30 мин в присутствии или отсутствии 10 mM CaCl₂ и 50 μ M ингибитора N-ацетил-Leu-Leu-норлейцинала (Sigma, США). Образовавшийся продукт регистрировали на флуориметре Hitachi-850 (Япония) при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Активность кальпаинов определяли в пробах с 10 mM CaCl₂ и с ингибитором. За единицу активности принимали количество фермента, при котором гидролизует 1 нмоль Suc-LLVY-AMC в

течение 1 мин. Удельную активность выражали в единицах активности на 1 мг белка. Содержание белка определяли по методу Лоури.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета статистических программ Statistica 6.0. В зависимости от вида распределения результаты представлены как $m \pm M$, где m – среднее выборочное, M – ошибка среднего, или как медиана с интерквартильным размахом (25-й и 75-й процентиля). Значимость различий исследовали с помощью t-критерия Стьюдента или критерия Манна – Уитни.

Результаты исследования

Изучение экспрессии генов матриксных металлопротеиназ ММП-1, -2, -9, -14 в тканях злокачественных новообразований и диспластически измененного эпителия гортани показало, что исследуемые показатели определялись во всех образцах. При статистической обработке результатов было обнаружено, что уровни экспрессии исследуемых генов в опухолевой и неизменной ткани не различались, что, по-видимому, может говорить об увеличении деструктивного потенциала опухоли. Ранее было показано, что клетки карциномы экспрессируют индуктор экстраклеточных матриксных металлопротеиназ ЕММРIN, который, находясь на цитоплазматической мембране опухолевых клеток, может увеличивать продукцию ММП-2 и ММП-9 клетками микроокружения [5]. Возможно, такое влияние опухоли распространяется и на окружающую неизменную ткань.

Сравнительный анализ результатов ПЦР-РВ генов ММП-1, -2, -9 и -14 в ткани диспластически измененного эпителия и рака гортани показал наличие различий в их экспрессии (табл. 1). В группах с диспластическими изменениями эпителия и раком гортани T₁N₀M₀ стадии показаны значимые различия в экспрессии генов ММП-1, ММП-2 и ММП-14 (табл. 1).

Экспрессия гена ММП-1 ($p=0,016$) была почти в 3 раза выше в опухолевой ткани у больных РГ T₁N₀M₀ стадии, по сравнению с тканями больных с диспластическими изменениями эпителия, и сохраняла тенденцию к росту с увеличением размера первичного опухолевого очага. Значительно возрастал уровень экспрессии ММП-14 в тканях опухоли у пациентов РГ T₁N₀M₀ стадии ($p=0,007$) по сравнению с группой пациентов с диспластически измененным эпителием – разница составила 45%.

Далее уровень экспрессии ММП-14 возрастал с увеличением размера опухолевого узла. Экспрессия гена ММП-2 была выше в диспластически измененных тканях по сравнению с тканью рака гортани T₁N₀M₀ стадии; с увеличением стадии заболевания наблюдалось возрастание показателя.

Обсуждение

Высокие значения экспрессии генов ММП-1 и ММП-14 на ранних стадиях рака гортани, возможно, указывают на важную роль этих показателей в инициации и развитии злокачественного процесса, что согласуется с литературными данными [14, 15, 17, 20, 21]. Патогенез злокачественных заболеваний тесным образом связан не только с усилением внеклеточного протеолиза, но и с изменением состояния системы деградации белков внутри клетки. Протеасомы являются основным компонентом этой

системы, играя важную роль в процессах расщепления собственных белков клетки, и опосредуют процессы клеточного деления, дифференцировки, иммунного ответа и др. Результаты исследования химотрипсинподобной активности протеасом в опухолевой, диспластической и неизменной ткани гортани представлены в табл. 2. В группе больных раком гортани активность протеасом в опухоли была достоверно выше по сравнению с таковой в диспластической ткани. Также наблюдалось увеличение активности кальпаинов в ткани опухоли по сравнению с диспластической тканью. Выявленный факт позволяет сделать вывод об активации внутриклеточного протеолиза в ткани рака гортани как за счет протеасом, так и за счет кальпаинов. Стоит отметить, что функция последних в канцерогенезе плоскоклеточного рака до сих пор полностью не ясна.

Таблица 1

Сравнительная экспрессия генов матричных металлопротеиназ в опухолевой ткани и в диспластически измененном эпителии гортани

Показатели, у.е.	Диспластические процессы гортани	Опухолевая ткань T ₁ N ₀ M ₀	Опухолевая ткань T ₂₋₄ N ₁₋₃ M ₀	p
ММП-1	0,6 ± 0,37 n=8	1,76 ± 0,69 n=18	1,82 ± 0,597 n=10	p ₁ =0,016 p ₂ =0,05
ММП-2	1,64 ± 0,63 n=8	1,37 ± 0,15 n=21	1,65 ± 0,77 n=30	p ₁ =0,03 p ₂ =0,05
ММП-9	0,78 ± 0,21 n=8	1,57 ± 0,02 n=16	1,82 ± 0,24 n=11	p ₁ = 0,3 p ₂ =0,03
ММП-14	0,84 ± 0,21 n=11	1,22 ± 0,2 n=21	1,65 ± 0,09 n=30	p ₁ =0,007 p ₂ =0,002
GAPDH	2,09 ± 0,23 n=10	1,78 ± 0,49 n=20	1,86 ± 0,22 n=29	p ₁ =0,07 p ₂ =0,08

Примечание. p₁ – значимость различий между опухолевой тканью стадии T₂₋₄N₁₋₃M₀ и диспластическими процессами гортани, p₂ – значимость различий между опухолевой тканью стадии T₁N₀M₀ и диспластическими процессами гортани; n – количество пациентов в группе.

Таблица 2

Тотальная активность протеасом и кальпаинов в диспластически измененной и опухолевой тканях гортани

Вид ткани	n	Тотальная активность протеасом, 10 ³ Ед/мг белка	n	Общая активность кальпаинов, 10 ³ Ед/мг белка
Диспластически измененный эпителий	10	43,3 (31,5–56,4)	10	28,6 (13,5–39,4)
Опухолевая ткань	23	59,8 (37,2–120,0)*	10	125,7 (67,0–256,0)*

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с диспластически измененным эпителием (p<0,05); n – количество пациентов в группе.

Увеличение активности протеасом в ткани РГ по сравнению с гиперпластическими процессами, вероятно, связано со значительным повышением интенсивности клеточных процессов, многие участники которых являются субстратами протеасом: белки-регуляторы клеточного цикла, многие транскрипционные факторы, белки pRb и p53, ингибитор NF-κB IκB, белки, контролирующие активность каспаз, компоненты сигнальных путей [16]. Соответственно, происходит и усиление аппарата деградации белков. Полученные результаты, свидетельствующие о значительном повышении активности кальпаинов в опухолевой ткани по сравнению с гиперпластической, согласуются с данными N.O. Carragher et al. (2004) о повышении активности кальпаинов при трансформации клеток в клеточных культурах и позволяют сделать вывод о преимущественном участии кальпаинов в процессах, свойственных только злокачественным тканям [13].

Заключение

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что внеклеточные и внутриклеточные протеазы играют важную роль в развитии рака гортани. Показана целесообразность дальнейших исследований показателей протеолиза в тканях диспластически измененного эпителия и РГ с целью разработки показателей, важных для обнаружения заболевания на ранних стадиях рака данной локализации. Выявленные особенности патогенеза диспластических процессов и РГ в будущем помогут выделить дополнительные объективные критерии, которые позволят адекватно оценить онкологический риск и прогнозировать у больных развитие злокачественного новообразования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барышев В.В., Андреев В.Г., Попучиев В.В., Ежов С.В. Современные аспекты изучения респираторного папилломатоза. Ч. 1. Этиология, патогенез, диагностика // Сибирский онкологический журнал. 2009. № 5(35). С. 67–72.
2. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе // Сибирский онкологический журнал. 2003. № 2. С. 62–70.
3. Клишо Е.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л., Черемисина О.В., Чижевская С.Ю., Шишкин Д.А. Прогностическая значимость определения металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов у больных плоскоклеточным раком органов головы и шеи // Онкохирургия. 2011. Т. 3, № 1. С. 17–22.
4. Кондакова И.В., Клишо Е.В., Савенкова О.В., Какурина Г.В., Чойнзонов Е.Л., Шишкин Д.А., Мухамедов М.Р. Матриксные металлопротеиназы 2 и 9 как факторы метастазирования злокачественных новообразований головы и шеи // Биомедицинская химия. 2008. Т. 54, № 5. С. 555–560.
5. Кондакова И.В., Клишо Е.В., Савенкова О.В., Шишкин Д.А., Чойнзонов Е.Л. Патогенетическая значимость системы матриксных металлопротеиназ при плоскоклеточном раке головы и шеи // Сибирский онкологический журнал. 2011. № 1 (43). С. 29–33.
6. Малахова Е.В., Кондакова И.В., Черемисина О.В., Какурина Г.В., Меньшиков К.Ю. Экспрессия генов матриксных металлопротеиназ и их тканевых ингибиторов в тканях опухолей у больных раком гортани и гортаноглотки // Сибирский онкологический журнал. 2012. № 1 (49). С. 36–41.
7. Осипов В.Д. Роль неспецифических опухолевых маркеров и клинко-морфологических показателей в диагностике и лечении предрака и раннего рака гортани: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Томск, 2006. 38 с.
8. Поддубный Б.К., Белоусова Н.В., Унгуадзе Г.В. Диагностическая и лечебная эндоскопия верхних дыхательных путей. М.: Практическая медицина, 2006. 256 с.
9. Состояние онкологической помощи населению России в 2012 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2013. 232 с.
10. Спирина Л.В., Кондакова И.В. Роль внутриклеточного специфического протеолиза в онкогенезе // Вопросы онкологии. 2008. № 6. С. 690–694.
11. Спирина Л.В., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л., Шарова Н.П., Чижевская С.Ю., Шишкин Д.А. Активность и субъединичный состав протеасом в плоскоклеточных карциномах головы и шеи // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 149, № 1. С. 89–92.
12. Унгуадзе Г.В., Поддубный Б.К., Белоусова Н.В., Концевая А.Ю. Эндоскопическая диагностика и лазерная деструкция рака гортани // Современная онкология. 2003. Т. 7, № 3. С. 122–125.
13. Carragher N.O., Fonseca B.D., Frame M.C. Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions // Neoplasia. 2004. Vol. 6. P. 53–73.
14. Chaudhary A.K., Singh M., Bharti A.C., Asotra K., Sundaram S., Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck // J. Biomed. Sci. 2010. Vol. 17. P. 10–18. doi: 10.1186/1423-0127-17-10.
15. Coussens L.M., Tinkle C.L., Hanahan D., Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis // Cell. 2000. Vol. 103. P. 481–490.
16. Driscoll J.J., Minter A., Driscoll D.A., Burris J.L. The ubiquitin-proteasome protein degradation pathway as a therapeutic strategy in the treatment of solid tumor malignancies // Anticancer Agents Med. Chem. 2011. Vol. 11 (2). P. 242–246.
17. Katayama A., Bandoh N., Kishibe K. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis // Clin. Cancer Res. 2004. Vol. 10 (2). P. 634–640.
18. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // Methods. 2001. Vol. 25 (4). С. 402–408.
19. Sandmann S., Prenzel F., Shaw L., Schauer R., Unger T. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium-influence of the calpain inhibitor CAL 9961 // Br. J. Pharmacol. 2002. Vol. 135 (8). 1951–1958.
20. Stokes A., Joutsa J., Ala-Aho R., Pitchers M., Pennington C.J., Martin C., Premachandra D.J., Okada Y., Peltonen J., Grénman R., James H.A., Edwards D.R., Kähäri V.M. Expression profiles and clinical correlations of degradome components in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma // Clin. Cancer Res. 2010. Vol. 16 (7). P. 2022–2035. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2525.
21. Yen C.Y., Chen C.H., Chang C.H., Tseng H.F., Liu S.Y., Chuang L.Y., Wen C.H., Chang H.W. Matrix metalloproteinases (MMP) 1 and MMP10 but not MMP12 are potential oral cancer markers // Biomarkers. 2009. Vol. 14 (4). P. 244–249. doi: 10.1080/13547500902829375.
22. Zhang H.K., Liu H.G. Is severe dysplasia the same lesion as carcinoma in situ? 10-year follow-up of laryngeal precancer-

ous lesions // *Acta Otolaryngol.* 2012. Vol. 132 (3). P. 325–328. doi: 10.3109/00016489.2011.642812.

Поступила 8.02.14

REFERENCES

1. Baryshev V.V., Andreev V.G., Popuchiev V.V., Ezhov S.V. Modern aspects of studding respiratory papillomatosis. Part I. Etiology, pathogenesis, diagnosis // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2009. № 5(35). P. 67–72. [in Russian]
2. Klishe E.V., Kondakova I.V., Chojnzonov E.L. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2003. № 2. P. 62–70. [in Russian]
3. Klishe E.V., Kondakova I.V., Chojnzonov E.L., Cheremisinina O.V., Chizhevskaja S.Ju., Shishkin D.A. Prognostic significance of determination of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors of patients with head and neck squamous cell carcinoma // *Onkologicheskij zhurnal.* 2011. Vol. 3, (1). P. 17–22. [in Russian]
4. Kondakova I.V., Klishe E.V., Savenkova O.V., Kakurina G.V., Chojnzonov E.L., Shishkin D.A., Muhamedov M.R. Matrix metalloproteinase 2 and 9 as the factor of head and neck tumor metastasis // *Biomedicinskaja himija.* 2008. Vol. 54 (5). P. 555–560. [in Russian]
5. Kondakova I.V., Klishe E.V., Savenkova O.V., Shishkin D.A., Chojnzonov E.L. Pathogenetic significance of the matrix metalloproteinase system in squamous cell head and neck cancer // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2011. № 1 (43). P. 29–33. [in Russian]
6. Malahova E.V., Kondakova I.V., Cheremisinina O.V., Kakurina G.V., Men'shikov K.Ju. Gene expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in tumor tissues of patients with laryngeal and laryngopharyngeal cancers // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2012. № 1 (49). P. 36–41. [in Russian]
7. Osipov V.D. Role of non-specific tumor markers and clinical-morphological parameters in diagnosis and treatment of precancer and early cancer of the larynx: Author's DSc thesis. Tomsk, 2006. 38 p. [in Russian]
8. Poddubnyj B.K., Belousova N.V., Ungiadze G.V. Diagnostic and therapeutic endoscopy of the upper respiratory tract. M.: Prakticheskaja medicina, 2006. 256 p. [in Russian]
9. The state of cancer care to the population of Russia in 2012. / Eds. A.D. Kaprin, V.V. Starinskij, G.V. Petrova. M., 2013. 232 p. [in Russian]
10. Spirina L.V., Kondakova I.V. Role of intracellular specific proteolysis in cancerogenesis // *Voprosy onkologii.* 2008. № 6. P. 690–694. [in Russian]
11. Spirina L.V., Kondakova I.V., Chojnzonov E.L., Sharova N.P., Chizhevskaja S.Ju., Shishkin D.A. Activity and subunit composition of proteasomes in head and cervical squamous cell carcinomas // *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny.* 2010. Vol. 149 (1). P. 89–92. [in Russian]
12. Ungiadze G.V., Poddubnyj B.K., Belousova N.V., Koncevaja A.Ju. Endoscopic diagnosis and laser destruction of laryngeal cancer // *Sovremennaja onkologija.* 2003. Vol. 7 (3). P. 122–125. [in Russian]
13. Carragher N.O., Fonseca B.D., Frame M.C. Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological functions // *Neoplasia.* 2004. Vol. 6. P. 53–73.
14. Chaudhary A.K., Singh M., Bharti A.C., Asotra K., Sundaram S., Mehrotra R. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck // *J. Biomed. Sci.* 2010. Vol. 17. P. 10–18. doi: 10.1186/1423-0127-17-10.
15. Coussens L.M., Tinkle C.L., Hanahan D., Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis // *Cell.* 2000. Vol. 103. P. 481–490.
16. Driscoll J.J., Minter A., Driscoll D.A., Burris J.L. The ubiquitin-proteasome protein degradation pathway as a therapeutic strategy in the treatment of solid tumor malignancies // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2011. Vol. 11 (2). P. 242–246.
17. Katayama A., Bandoh N., Kishibe K. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis // *Clin Cancer Res.* 2004. Vol. 10 (2). P. 634–640.
18. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // *Methods.* 2001. Vol. 25 (4). C. 402–408.
19. Sandmann S., Prenzel F., Shaw L., Schauer R., Unger T. Activity profile of calpains I and II in chronically infarcted rat myocardium-influence of the calpain inhibitor CAL 9961 // *Br. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 135 (8). 1951–1958.
20. Stokes A., Joutsa J., Ala-Aho R., Pitchers M., Pennington C.J., Martin C., Premachandra D.J., Okada Y., Peltonen J., Grénman R., James H.A., Edwards D.R., Kähäri V.M. Expression profiles and clinical correlations of degradome components in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma // *Clin. Cancer Res.* 2010. Vol. 16 (7). P. 2022–2035. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2525.
21. Yen C.Y., Chen C.H., Chang C.H., Tseng H.F., Liu S.Y., Chuang L.Y., Wen C.H., Chang H.W. Matrix metalloproteinases (MMP) 1 and MMP10 but not MMP12 are potential oral cancer markers // *Biomarkers.* 2009. Vol. 14 (4). P. 244–249. doi: 10.1080/13547500902829375.
22. Zhang H.K., Liu H.G. Is severe dysplasia the same lesion as carcinoma in situ? 10-year follow-up of laryngeal precancerous lesions // *Acta Otolaryngol.* 2012. Vol. 132 (3). P. 325–328. doi: 10.3109/00016489.2011.642812.

ОПЫТ РАБОТЫ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ

УДК: 616.8-006-079.4:612.014.2-091.8

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

А.П. Надеев, В.А. Жукова, М.А. Козяев, М.А. Травин, К.Е. Яценко

*ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, г. Новосибирск
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52, e-mail: nadeevngma@mail.ru*

Целью исследования было изучение нозологической структуры опухолей ЦНС и роли иммуногистохимического исследования в верификации их гистогенеза.

Материал и методы. Исследовали 162 образца биопсийного и операционного материала опухолей ЦНС, оперированных в нейрохирургических отделениях стационаров г. Новосибирска и Сибирского федерального округа в период 2004–2013 гг.

Результаты. В структуре первичных опухолей ЦНС преобладали астроцитарные опухоли (47,9 %), менингеальные опухоли (9,3 %), олигодендроглиальные опухоли (6,3%) с преимущественной локализацией в больших полушариях головного мозга (81 %). Метастатическое поражение ЦНС наблюдалось в 11 % случаев, при этом преобладающими были метастазы рака. Воспалительные псевдоопухоли составили 3,1 %. Применение иммуногистохимического метода с широкой панелью антител, прежде всего пан-цитокератина, виментина, общего лейкоцитарного антигена, эпителиального мембранного антигена, глиального фибриллярного белка, позволило уточнить гистогенез опухолей ЦНС в 29,6 % наблюдений.

Ключевые слова: опухоли центральной нервной системы, иммуногистохимическое исследование.

EXPERIENCE IN USING IMMUNOHISTOCHEMICAL METHOD IN DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM TUMORS

A.P. Nadeev, V.A. Zhukova, M.A. Kozyaev, M.A. Travin, K.E. Yatsenko
*Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk
52, Kkrasny Prospect, 630091-Novosibirsk, Russia, e-mail: nadeevngma@mail.ru*

The purpose of the study was to evaluate the nosological structure of central nervous system (CNS) tumors and the role of immunohistochemical assay in verification of their histogenesis.

Material and methods. 162 biopsy and surgical specimens of CNS tumors obtained from neurosurgical departments of hospitals in Novosibirsk and Siberian Federal District in the period 2004–2013 were studied.

Results. In the structure of primary CNS tumors, astrocytic tumors were the most common (47.9 %) followed by meningeal tumors (9.3 %), and oligodendrogial tumors (6.3 %) located predominantly in the cerebral hemispheres of the brain (81 %). CNS metastases occurred on 11% of cases, there were mainly malignant epithelial tumor metastases. Inflammatory pseudotumors were observed in 3.1 % of cases. The use of immunohistochemistry with a broad panel of antibodies, mainly: pan-cytokeratin, vimentin, leukocyte common antigen, epithelial membrane antigen, glial fibrillary acidic protein allowed the histogenesis of CNS tumors to be clarified in 29.6 % of cases.

Key words: central nervous system tumors, immunohistochemical assay.

Опухоли центральной нервной системы (ЦНС) занимают 9-е место в структуре смертности у взрослых, а в детском возрасте – 3-е место после опухолей кроветворной и лимфатической систем. В Российской Федерации показатель смертности от опухолей ЦНС составил в 2009 г. 4,6 на 100 тыс.

населения [1]. Аналогичный показатель отмечен и для европейских стран. Показатель смертности от опухолей ЦНС колеблется в зависимости от региона России, составляя от 3 до 8,5 на 100 тыс. населения в год [5]. Показано, что тенденция увеличения частоты опухолей ЦНС касается опреде-

ленных нозологических форм. Проведенные исследования продемонстрировали увеличение в детском возрасте частоты таких форм опухолей, как медуллобластома, PNET-опухоль, в то время как частота астроцитом, наоборот, уменьшилась [4, 14].

В развитии опухолей ЦНС играют роль разнообразные факторы, однако общепризнанным является ведущее значение генетических факторов [2]. Нередко опухоли ЦНС сопровождаются сосудистыми мальформациями или являются врожденными [12, 15]. В зависимости от того, является ли опухоль первичной или метастазом другой опухоли, назначается лечение и определяется прогноз для больных с опухолями ЦНС [3, 4, 9]. В связи с этим определение гистогенеза опухолей ЦНС является актуальной задачей современной онкологии. Опухоли ЦНС фенотипически и метаболически сходны между собой и со структурой метастазов из других органов, особенно в тех ситуациях, когда опухоли носят недифференцированный характер, или после проведении лучевой терапии [6, 9, 11]. Для тканевой верификации различных опухолей головного мозга широко используется иммуногистохимический метод [3, 6, 7].

Целью исследования было изучение нозологической структуры опухолей ЦНС и роли иммуногистохимического (ИГХ) исследования в верификации их гистогенеза.

Материал и методы

Исследовали 162 образца биопсийного и операционного материала опухолей ЦНС, полученных в нейрохирургических отделениях стационаров г. Новосибирска и Сибирского федерального округа в период 2004–2013 гг. Образцы ткани фиксировали в 10 % нейтральном формалине, обезжировали в спиртах, заливали в парафин. При проведении патогистологического исследования учитывали клинические данные, возраст больного, интраоперационное описание внешнего вида опухоли, ее локализацию [3, 4].

Для определения гистогенеза все опухоли ЦНС, независимо от результатов гистологического исследования, были направлены на иммуногистохимическое исследование. Срезы опухолей обрабатывали следующими антителами (NOVOCASTRA Ltd, Великобритания): панцитокератин, виментин, общий лейкоцитарный антиген, эпителиальный

мембранный антиген, глиальный фибриллярный белок, нейрон-специфическая энолаза и ряд других; всего в исследовании было использовано 30 антител. Для выявления иммунного окрашивания применяли стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод с докрасиванием ядер гематоксилином [6]. При диагностике опухолей ЦНС использовали классификацию ВОЗ (2007) [17].

Результаты исследования

Большинство образцов (86,5 %) были направлены на морфологическое исследование с диагнозом «Внутричерепная опухоль» или «Объемное образование». После патогистологического исследования материал был распределен по нозологическим формам следующим образом: первичные опухоли ЦНС – 142 (90,1 %), метастазы опухолей в ЦНС – 13 (8 %), воспалительные (неопухолевые) заболевания – 3 (1,8 %) случая (табл. 1). Среди первичных опухолей преобладали астроцитарные опухоли – 49 (30,2 %), из них в 24 (48,9 %) наблюдениях были глиобластомы в вариантах мультиформной, изоморфной, гигантоклеточной и глиосарком. Олигодендроглиальные опухоли по частоте встречаемости заняли 2-е место – 15 (9,3 %), из них преобладали злокачественные олигоастроцитомы – 60 %. На 3-м месте оказались менингиоэпителиальные опухоли – 11 (6,9 %) наблюдений.

Однако 48 (29,6 %) опухолей ЦНС остались неидентифицированными («недифференцированные опухоли») или требовали проведения дифференциального диагноза. В связи с этим было проведено иммунофенотипирование опухолей с применением широкой панели антител. После ИГХ все опухоли ЦНС были идентифицированы, что несколько изменило их нозологическую структуру. Доля первичных опухолей равнялась 84,5 %, а метастазов опухолей в ЦНС – увеличилась до 12,3 %, из которых в 13 случаях были метастазы рака, в 2 случаях – метастаз меланомы, в 3 наблюдениях – В-крупноклеточной лимфомы.

Гистологическая структура первичных опухолей ЦНС после проведения иммунофенотипирования была представлена следующим образом: лидирующее положение сохранили астроцитарные опухоли – их доля увеличилась до 43,8% (71 наблюдение), из них: глиобластомы – 69,1%, при этом возросла доля мультиформных, изоморфных гигантоклеточных вариантов глиобластом, с уменьшением количества глиосарком. Во всех

случаях определяющим фактором в верификации астроцитарных опухолей была экспрессия глиального кислого фибриллярного белка, кроме того, часто при астроцитарных опухолях верифицировали экспрессию виментина, S-100. При определении степени злокачественности доброкачественных и злокачественных астроцитарных опухолей ЦНС использовали маркер пролиферации клеток – Ki-67: для доброкачественных астроцитом уровень его экспрессии составлял до 4 %, для анапластических астроцитом – до 10 % клеток, для глиобластом – 15–20 % [17].

Опухоли из менинготелиальных клеток заняли 2-е место, их количество возросло и составило 9,3% (15 наблюдений). Дифференциальная диагностика проводилась в основном между менингеальными и астроцитарными опухолями. При дифференциальной диагностике опухолей из менинготелиальных клеток определяющей была положительная экспрессия панцитокератина (90 %) и виментина (100 %), а также S-100 (50 %).

После иммуногистохимического исследования практически в 2 раза увеличилась доля эмбриональных, нейрональных и эпендимарных опухолей, составив 5,6 %, 4,9 % и 4,3 % соответственно. Эмбриональные опухоли включали нейробластомы и медуллобластомы. После ИГХ диагноз был изменен с недифференцированной злокачественной опухоли головного мозга и злокачественной астроцитомы на полушарную нейробластому, с глиосаркомы – на медуллобластому. В 2 случаях диагностировали нейроцитому: в одном случае диагноз был подтвержден, в другом – диагноз был изменен (первоначальный диагноз – «дифференцированная олигодендроастроцитомы»). При ИГХ выявляли выраженную экспрессию синаптофизина, нейронспецифической энолазы.

Воспалительные псевдоопухоли, представленные неспецифическими воспалительными процессами (лейкоэнцефалит с реактивным глиоматозом), составили 5 (3,1 %) наблюдений.

При анализе топической локализации опухолей, имеющей важное диагностическое и прогности-

Таблица 1

Сравнительный анализ клинического, патогистологического и иммуногистохимического диагнозов опухолей ЦНС

Опухоли ЦНС	Клинический диагноз	Патогистологический диагноз	Иммуногистохимический диагноз
Внутричерепная опухоль	138 (85,2 %)	6 (3,7 %)	–
Астроцитарные опухоли	6 (3,7 %)	25 (15,4 %)	42(25,9 %)
Глиобластома	7 (4,3 %)	24 (14,8 %)	29 (17,9 %)
Олигодендроглиальные опухоли	–	6 (3,7 %)	5 (3,1 %)
Злокачественные олигоастроцитомы	1 (0,6 %)	9 (5,6 %)	6 (3,7 %)
Опухоли из менинготелиальных клеток	4 (2,5 %)	11 (6,8 %)	15 (9,3 %)
Эмбриональные опухоли	2 (1,2 %)	6 (3,7 %)	9 (5,6 %)
Нейрональные опухоли	1(0,6 %)	4 (2,5 %)	8 (4,9 %)
Эпендимарные опухоли	1 (0,6 %)	4 (2,5 %)	7 (4,3 %)
Сосудистые опухоли	–	5 (3,1 %)	9 (5,6 %)
Аденома / рак гипофиза	–	3 (1,8 %)	3/1 (2,5 %)
Невринома	1 (0,6 %)	1 (0,6 %)	1 (0,6 %)
Миеломная болезнь	–	–	1 (0,6 %)
PNET-опухоль	–	–	1 (0,6 %)
Метастазы злокачественных опухолей	1 (0,6 %)	13 (8,02 %)	20 (12,3 %)
Воспалительные заболевания	–	3 (1,8 %)	5 (3,1 %)
Всего:	162	162	162

ческое значение, после иммунофенотипирования выяснилось, что в большинстве случаев опухоли локализовались в больших полушариях головного мозга – 81,5 % (табл. 2). Там были расположены астроцитарные опухоли – в 41,9 % наблюдений, метастазы злокачественных опухолей – в 9,8 %. В мозжечке были локализованы эмбриональные опухоли, в частности медуллобластомы, в желудочках были расположены в основном эпендимарные и нейрональные опухоли [8]; в спинном мозге – эпендимарные опухоли, менингиома, метастазы злокачественных опухолей, невринома, PNET-опухоль.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что нозологическая структура опухолей ЦНС характеризуется преобладанием первичных опухолей, среди которых астроцитарные и менингиомаоподобные опухоли занимают ведущее положение. Наши данные несколько отличаются от результатов других исследований, что связано, вероятно, с количеством исследованной выборки. Так, в Иране при анализе банка данных опухолей ЦНС за 10-летний период установлено преобладание менингиом, астроцитом, глиобластом и

эпендимом, общая заболеваемость первичными опухолями ЦНС составила 2,74 на 100 тыс. населения [10]. В Южной Корее было проанализировано 5 692 первичные опухоли ЦНС: у взрослых преобладали менингиомы, глиобластомы, у молодых людей (до 19 лет) – медуллобластома [13]. В 2005 г. в Австрии после исследования 1688 первичных опухолей ЦНС было выявлено, что ведущими опухолями являются менингиомы (29,9 %), глиобластомы (20 %) и аденомы гипофиза (8,9 %) [16]. Применение иммуногистохимического метода позволило окончательно верифицировать гистогенез 29,6 % опухолей ЦНС.

Заключение

В структуре первичных опухолей ЦНС преобладали астроцитарные опухоли (47,9 %), менингеальные опухоли (9,3 %), олигодендроглиальные опухоли (6,3 %) с преимущественной локализацией в больших полушариях головного мозга (81 %). Воспалительные псевдоопухоли составили 3,1 %. Метастатическое поражение ЦНС наблюдалось в 11 % случаев, при этом преобладающими были метастазы рака. Применение иммуногистохимического метода с широкой панелью антител, прежде всего, панцитокератина, виментина, общего лейкоцитарного антигена, эпителиального мем-

Таблица 2

Локализации опухолей центральной нервной системы

Опухоль ЦНС	Локализация опухоли						
	Полушария	Мозжечок	Желудочки	Спинной мозг	Гипофиз	Мозолистое тело	Эпифиз
Астроцитарные опухоли	40	-	-	-	-	2	-
Глиобластомы	28	-	-	-	-	1	-
Олигодендроглиома	5	-	-	-	-	-	-
Злокачественная олигоастроцитом	6	-	-	-	-	-	-
Менингеальные	11	1	2	1	-	-	-
Эпендимарные	1	-	1	4	-	-	1
Опухоли гипофиза	-	-	-	-	4	-	-
Сосудистые опухоли	9	-	-	-	-	-	-
Эмбриональные	6	2	1	-	-	-	-
Миеломная болезнь	-	-	-	1	-	-	-
Нейрональные	5	-	3	-	-	-	-
Невринома	-	1	-	-	-	-	-
PNET-опухоль	-	-	-	1	-	-	-
Метастазы злокачественных опухолей	16	3	-	1	-	-	-
Воспалительные заболевания	5	-	-	-	-	-	-
Всего	132	6	7	8	4	2	1

бранного антигена, позволило уточнить гистогенез опухолей ЦНС в 29,6 % наблюдений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксель Е.М., Давыдов М.И. Смертность населения России и стран СНГ от злокачественных новообразований в 2008 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина. 2011. Т. 22, № 3с. С. 93–123.
2. Борисов К.Е., Сакаева Д.Д. Генные нарушения и молекулярно-генетические подтипы злокачественных глиом // Архив патологии. 2013. Т. 75, № 3. С. 52–61.
3. Мацко Д.Е., Кориунов А.Г. Атлас опухолей центральной нервной системы. СПб.: РНХИ им. проф. А.Л. Поленова, 1998. 200 с.
4. Никифоров Б.М., Мацко Д.Е. Опухоли головного мозга. СПб.: Питер, 2003. 320 с.
5. Писарев В.Б., Голуб Б.В., Смирнов А.В., Гуров Д.Ю. Распространенность различных гистологических вариантов опухолей головного мозга в Волгоградской области по данным операционных биопсий за период 2001–2006 гг. // Архив патологии. 2008. № 4. С. 17–20.
6. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. Казань: Титул, 2011. 456 с.
7. Ballester L.Y., Wang Z., Shandilya S., Miettinen M., Burger P.C., Eberhart C.G., Rodriguez F.J., Raabe E., Nazarian J., Warren K., Quezado M.M. Morphologic characteristics and immunohistochemical profile of diffuse intrinsic pontine gliomas // Am. J. Surg. Pathol. 2013. Vol. 37 (9). P. 1357–1364. doi: 10.1097/PAS.0b013e318294e817.
8. Dănăilă L. Primary tumors of the lateral ventricles of the brain // Chirurgia (Bucur). 2013. Vol. 108 (5). P. 616–630.
9. Gállego Pérez-Larraya J., Hildebrand J. Brain metastases // Handb. Clin. Neurol. 2014. Vol. 121. P. 1143–1157. doi: 10.1016/B978-0-7020-4088-7.00077-8.
10. Jazayeri S.B., Rahimi-Movaghar V., Shokraneh F., Saadat S., Ramezani R. Epidemiology of primary CNS tumors in Iran: a systematic review // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2013. Vol. 14 (6). P. 3979–3985.
11. Kim H.M., Kim do H., Jung W.H., Koo J.S. Metabolic phenotypes in primary unknown metastatic carcinoma // J. Transl. Med. 2014. Vol. 12. P. 2. doi: 10.1186/1479-5876-12-2.
12. Laure-Kamionowska M., Szymanska K., Biekiesinska-Figatowska M., Gierowska-Bogusz B., Michalak E., Klepacka T. Congenital glioblastoma coexisting with vascular developmental anomaly // Folia Neuropathol. 2013. Vol. 5 (4). P. 333–339.
13. Lee C.H., Jung K.W., Yoo H., Park S., Lee S.H. Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea // J. Korean Neurosurg. Soc. 2010. Vol. 48 (2). P. 145–152. doi: 10.3340/jkns.2010.48.2.145.
14. McKean-Cowdin R., Razavi P., Barrington-Trimis J., Baldwin R.T., Asgharzadeh S., Cockburn M., Tihan T., Preston-Martin S. Trends in childhood brain tumor incidence, 1973–2009 // J. Neurooncol. 2013. Vol. 115 (2). P. 153–160. doi: 10.1007/s11060-013-1212-5.
15. Stefanaki K., Alexiou G.A., Stefanaki C., Prodromou N. Tumors of central and peripheral nervous system associated with inherited genetic syndromes // Pediatr. Neurosurg. 2012. Vol. 48 (5). P. 271–285. doi: 10.1159/000351546.
16. Wöhrer A., Waldhör T., Heinzl H., Hackl M., Feichtinger J., Gruber-Mösenbacher U., Kiefer A., Maier H., Motz R., Reiner-Concin A., Richling B., Idriceanu C., Scarpatetti M., Sedivy R., Bankl H.C., Stiglbauer W., Preusser M., Rössler K., Hainfellner J.A. The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry // J. Neurooncol. 2009. Vol. 95 (3). P. 401–411. doi: 10.1007/s11060-009-9938-9.
17. WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System / Eds. D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee. Lyon, 2007. 309 p.

Поступила 29.04.14

REFERENCES

1. Aksel' E.M., Davydov M.I. Cancer mortality in population of Russia and CIS countries in 2008. // Vestnik RONC im. N.N. Blohina. 2011. Vol. 22 (3s). P. 93–123. [in Russian]
2. Borisov K.E., Sakaeva D.D. Genetic disorders and molecular genetic subtypes of malignant gliomas // Arhiv patologii. 2013. Vol. 75 (3). P. 52–61. [in Russian]
3. Macko D.E., Korshunov A.G. Atlas of tumors of the central nervous system. SPb.: RNHI im. prof. A.L. Polenova, 1998. 200 p. [in Russian]
4. Nikiforov B.M., Macko D.E. Brain tumors. SPb.: Piter, 2003. 320 p. [in Russian]
5. Pisarev V.B., Golub B.V., Smirnov A.V., Gurov D.Ju. Prevalence of different histological types of brain tumors in the Volgograd Region according to the data of intraoperative biopsies over the period of 2001 to 2006 // Arhiv patologii. 2008. № 4. P. 17–20. [in Russian]
6. Guidelines for immunohistochemical diagnosis of human tumors / Eds. S.V. Petrov, N.T. Rajhlin. Kazan': Titul, 2011. 456 p. [in Russian]
7. Ballester L.Y., Wang Z., Shandilya S., Miettinen M., Burger P.C., Eberhart C.G., Rodriguez F.J., Raabe E., Nazarian J., Warren K., Quezado M.M. Morphologic characteristics and immunohistochemical profile of diffuse intrinsic pontine gliomas // Am. J. Surg. Pathol. 2013. Vol. 37 (9). P. 1357–1364. doi: 10.1097/PAS.0b013e318294e817.
8. Dănăilă L. Primary tumors of the lateral ventricles of the brain // Chirurgia (Bucur). 2013. Vol. 108 (5). P. 616–630.
9. Gállego Pérez-Larraya J., Hildebrand J. Brain metastases // Handb. Clin. Neurol. 2014. Vol. 121. P. 1143–1157. doi: 10.1016/B978-0-7020-4088-7.00077-8.
10. Jazayeri S.B., Rahimi-Movaghar V., Shokraneh F., Saadat S., Ramezani R. Epidemiology of primary CNS tumors in Iran: a systematic review // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2013. Vol. 14 (6). P. 3979–3985.
11. Kim H.M., Kim do H., Jung W.H., Koo J.S. Metabolic phenotypes in primary unknown metastatic carcinoma // J. Transl. Med. 2014. Vol. 12. P. 2. doi: 10.1186/1479-5876-12-2.
12. Laure-Kamionowska M., Szymanska K., Biekiesinska-Figatowska M., Gierowska-Bogusz B., Michalak E., Klepacka T. Congenital glioblastoma coexisting with vascular developmental anomaly // Folia Neuropathol. 2013. Vol. 5 (4). P. 333–339.
13. Lee C.H., Jung K.W., Yoo H., Park S., Lee S.H. Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea // J. Korean Neurosurg. Soc. 2010. Vol. 48 (2). P. 145–152. doi: 10.3340/jkns.2010.48.2.145.
14. McKean-Cowdin R., Razavi P., Barrington-Trimis J., Baldwin R.T., Asgharzadeh S., Cockburn M., Tihan T., Preston-Martin S. Trends in childhood brain tumor incidence, 1973–2009 // J. Neurooncol. 2013. Vol. 115 (2). P. 153–160. doi: 10.1007/s11060-013-1212-5.
15. Stefanaki K., Alexiou G.A., Stefanaki C., Prodromou N. Tumors of central and peripheral nervous system associated with inherited genetic syndromes // Pediatr. Neurosurg. 2012. Vol. 48 (5). P. 271–285. doi: 10.1159/000351546.
16. Wöhrer A., Waldhör T., Heinzl H., Hackl M., Feichtinger J., Gruber-Mösenbacher U., Kiefer A., Maier H., Motz R., Reiner-Concin A., Richling B., Idriceanu C., Scarpatetti M., Sedivy R., Bankl H.C., Stiglbauer W., Preusser M., Rössler K., Hainfellner J.A. The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry // J. Neurooncol. 2009. Vol. 95 (3). P. 401–411. doi: 10.1007/s11060-009-9938-9.
17. WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System / Eds. D.N. Louis, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee. Lyon, 2007. 309 p.

ОБЗОРЫ

УДК: 616-006-07-08+615.849.1+615.37

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РАДИОИММУНОТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ

Е.В. Абакушина^{1,3}, Д.Н. Абакушин², Ю.Н. Анохин³

ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, г. Обнинск¹

ООО «Клиника № 1», г. Обнинск²

Обнинский институт атомной энергетики – филиал ФГАОУ ВПО

«Национальный исследовательский ядерный университет» «МИФИ», г. Обнинск³

249036, Калужская обл., г. Обнинск, ул. Королёва, 4,

e-mail: abakushina@mail.ru¹

Достижения молекулярной ядерной медицины широко применяются для диагностики и терапии заболеваний. Для радиоиммунодиагностики и радиоиммунотерапии (РИТ) используют антитела, конъюгированные с диагностическими или терапевтическими радионуклидами. Наиболее часто для РИТ используют моноклональные антитела (мАТ) против опухолеассоциированных антигенов, меченные альфа- или бета-излучающими радионуклидами. Применяя эту технологию, были достигнуты положительные результаты лечения лимфопролиферативных заболеваний. Менее чувствительными к РИТ оказались солидные опухоли. Считается, что РИТ больше подходит для лечения микроскопических образований и минимальной остаточной болезни благодаря тому, что меченные радионуклидами мАТ доставляют необходимую дозу радиации для уничтожения опухоли. Несмотря на некоторые успехи РИТ, продолжается поиск новых наиболее перспективных и значимых мишеней для радиоиммунодиагностики и РИТ. Для достижения этой цели первоначально требуется проведение экспериментов по изучению биодоступности и терапевтической эффективности меченых мАТ на моделях с использованием клеточных линий и лабораторных животных.

Ключевые слова: радиоиммунотерапия, злокачественные новообразования, моноклональные антитела, опухолеассоциированные антигены, радиоизотоп.

EXPERIMENTAL AND CLINICAL APPROACHES TO A RADIOIMMUNOTHERAPY IN ONCOLOGY

E.V. Abakushina^{1,3}, D.N. Abakushin², Ju.N. Anohin³

Medical radiological research center Ministry of Health of Russia, Obninsk¹

Medical center «Clinic № 1», Obninsk²

Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering of the National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk³

4, Koroleva St., 249036-Obninsk, Kaluga region, Russia,

e-mail: abakushina@mail.ru

Molecular nuclear medicine plays an important role in the diagnosis and therapy of cancer. Radioimmunodetection and radioimmunotherapy (RIT) involve the use of antibodies conjugated with diagnostic or therapeutic radionuclides, respectively. More often for RIT use the monoclonal antibodies against tumor-associated antigens, radiolabeled with alpha or beta-emitters. Encouraging results have been achieved with this technology in the management of hematologic malignancies. On the contrary, solid tumors have been less responsive. Radioimmunotherapy therefore is considered more suitable for the treatment of microscopic or minimal residual disease, allowing radiolabeled monoclonal antibodies to achieve uptake in tumors high enough to result in tumoricidal radiation doses. Despite these encouraging results, new potential target for radioimmunodetection and RIT should be found. For this purpose, a series of experiments will be performing to investigate the biodistribution and the therapeutic efficacy of radiolabeled monoclonal antibodies in cell culture and animal models.

Key words: radioimmunotherapy; malignant diseases, monoclonal antibodies, tumor-associated antigens, radionuclide.

Высокая эффективность радионуклидных методов диагностики не вызывают сомнения. Являясь одним из наиболее информативных, точных и чув-

ствительных методов обнаружения патологических изменений в организме, радионуклидная диагностика определяет научный и практический уровень

клинической медицины. Интенсивно развивается также и радионуклидная терапия, которая стала эффективным средством как самостоятельного, так и комбинированного лечения больных. Радиоиммунотерапия (РИТ) – это перспективное направление, сочетающее достижения современной ядерной медицины, иммунологии и биотехнологии. Молекулярная ядерная медицина играет важную роль в диагностике и терапии онкологических и инфекционных заболеваний. Она основана на принципах таргетной терапии, предполагающей направленный транспорт комплексов противоопухолевых антител с радионуклидом в опухолевый очаг. Антитела специфически связываются с антигенными детерминантами на опухолевых или других клетках, а радионуклид уничтожает эти клетки путем локального облучения. РИТ более эффективна при небольших опухолях или для лечения минимальной остаточной болезни. Именно в этих случаях моноклональные антитела (мАТ), связанные с радионуклидом, способны взаимодействовать с клеточными мишенями и оказывать радиотоксический эффект [1, 12, 33, 42, 44]. Радиоиммунотерапия стала активно изучаться почти 50 лет назад, но прошло около 25 лет, прежде чем теоретические знания нашли свое клиническое применение.

Основной подход к РИТ связан с использованием антител, меченных радионуклидами. Это может использоваться у химиорезистентных пациентов и пациентов, не чувствительных к воздействию неконъюгированных лекарственных антител. Также РИТ может быть эффективна при элиминации множественно-резистентных опухолевых клеток. Основная цель применения таких препаратов связана с целенаправленным уничтожением конкретных клеток, например опухолевых.

Использование молекул мАТ, способных специфически присоединиться к трансформированной клетке и уничтожить ее, представляется весьма перспективным направлением как с терапевтической, так и с диагностической точки зрения. Моноклональные антитела, которые служат для доставки радионуклида к опухоли, выбирают на основе распределения их антигенной мишени, специфичности и сродства связывания антитела с его мишенью. В настоящее время более 20 моноклональных антител (к CD20, CD22, CD25, CD30, CD37, CD71, HLA-DR и др.) отобраны для

клинического применения и уже многие из них используются для диагностики и лечения различных онкологических и других заболеваний, в том числе и методами РИТ. В зависимости от основных ядерно-физических характеристик радиоизотопа он может быть использован для диагностики и/или для радиотерапии. Например, радиоиммунотерапия использует преимущества специфического взаимодействия антитела с антигеном, чтобы осуществить направленный транспорт радиофармпрепарата для локального облучения патологического очага. За последние 20 лет, кроме мАТ, разработаны и другие соединения направленного транспорта радионуклида (пептиды, нановещества), которые избирательно взаимодействуют с трансформированными клетками. Такие соединения обладают специфической особенностью связываться только с определенной антигенной детерминантой, при этом происходит процесс направленной доставки терапевтического радионуклида к конкретной клетке.

Радиоиммунотерапия лимфопролиферативных заболеваний

В настоящее время радиоиммунотерапия уже используется для лечения лимфопролиферативных заболеваний и метастатических солидных опухолей. В этом направлении были достигнуты некоторые положительные результаты [18, 25, 27, 32, 41]. Для лечения неходжкинских лимфом в настоящее время одобрены 2 препарата: ^{90}Y -ибритумомаб тиуксетан (Зевалин) и ^{131}I -тозитумомаб (Бексар). Однако лечение солидных новообразований гораздо хуже поддается воздействию. В нескольких работах было отмечено положительное воздействие РИТ на минимальный объем опухоли или микрометастазы [14, 15, 36, 37].

Зевалин (Zevalin®) – это первый доступный на международном рынке препарат для радиоиммунотерапии. В феврале 2002 г. он одобрен комиссией по пищевым веществам и лекарственным средствам США (FDA) для лечения рецидивирующей или резистентной формы фолликулярной В-клеточной неходжкинской лимфомы (НХЛ) низкой степени злокачественности. Препарат сочетает высокую способность связываться с антигеном В-лимфоцитов, молекулой CD20, и локально воздействовать на клетку за счет радиоизотопа иттрия-90. Результаты клинических испытаний препарата при неходжкинских лимфомах продемонстрировали эффективность и безопасность

РИТ индолентных В-клеточных лимфом [18, 25, 41].

Лечение Зевалином начинается с внутривенной инфузии 250 мг/м² Ритуксимаба в первый день. В течение последующих 4 ч вводят ¹¹¹In-ибритумомаб тиуксетан, 185 МБк (5 мКи), дважды оценивают органоспецифическое биораспределение препарата в интервале 2–24 ч и 48–72 ч и проводят дозиметрический контроль. На 7, 8 или 9-й день пациенту делают внутривенную инъекцию ⁹⁰Y-ибритумомаба тиуксетана (250 мг/м²) в дозе 11,1 или 14,8 МБк/кг (0,3 или 0,4 мКи/кг) в зависимости от количества тромбоцитов, с максимальной общей дозой 1,184 МБк (32 мКи) [20]. Такая схема лечения обеспечивает высокую биодоступность именно в месте расположения опухолевых клеток и предотвращает распространение радиофармпрепарата лимфоцитами по всему организму. Как правило, в течение 6–9 мес после проведения терапии фракция нормальных В-клеток восстанавливается за счёт CD20-негативных клеток-предшественников.

Одно из значимых клинических исследований показало, что лечение препаратом Зевалин пациентов, которые были резистентны или мало чувствительны к лечению чистыми антителами, привело к увеличению числа общих ответов на РИТ до 74 %. В рандомизированное контролируемое клиническое исследование 3-й фазы были включены 143 пациента. Задачей исследования было сравнение эффективности РИТ Зевалином и монотерапии Ритуксимабом (Мабтера) пациентов с фолликулярной или трансформированной НХЛ низкой степени злокачественности. В результате лечения 80 % пациентов, получавших Зевалин, дали положительный ответ на терапию, причем у 30 % пациентов отмечена полная регрессия опухоли. Суммарное количество ответов у пациентов при лечении Зевалином было значительно (56 %) и статистически достоверно выше ($p < 0,002$), чем в группе пациентов, проходивших терапию Ритуксимабом (16 %). На сегодняшний день показана 10-летняя выживаемость пациентов с неходжкинскими лимфомами, прошедших курс лечения Зевалином [40].

Недавно в рандомизированном исследовании, проведенном израильскими учеными, было показано, что пациенты с рецидивирующей и рефрактерной формой неходжкинской лимфомы, готовящиеся к трансплантации аутологичных ство-

ловых клеток, имеют более хорошие результаты приживления клеток костного мозга после применения РИТ Зевалином совместно с высокодозной химиотерапией (59 %) по сравнению с химиотерапией без Зевалина (37 %) [39].

При лечении Зевалином в ряде случаев отмечались чрезмерное накопление препарата в организме и незначительные побочные эффекты. Среди наиболее частых явлений наблюдались астения (35 %), тошнота (25 %), озноб (21 %), лихорадка (13 %), головная боль и першение в горле (9 %). Вследствие некоторой миелосупрессии отмечались цитопения (тромбоцитопения, нейтропения), анемия и геморрагия.

В последующих исследованиях важно оценить эффективность препарата Зевалин при лечении ранних стадий заболевания, а также возможность его использования в терапии других разновидностей лимфом.

Радиоиммунотерапия солидных опухолей и метастатических поражений

Радиоиммунотерапия может применяться и при некоторых солидных опухолях. Клинические исследования проводились при лечении рака предстательной железы, щитовидной железы, молочной железы, меланомы, рака яичников и шейки матки, карциномы легкого, колоректального рака и глиомы головного мозга высокой степени злокачественности [17, 30, 36, 44]. Большинство МАТ было разработано для опухолевых антигенов с высокой клеточной экспрессией, включая HER-2/neu [30, 34], рецептор эпидермального фактора роста, раковоэмбриональный антиген (CEA) [31], MUC1, Lewis Y [19] и внеклеточный домен клеток рака молочной железы SK-BR-3 [22].

В мире ведутся исследования по поиску новых мишеней для радиоиммунотерапии. Ученые из США недавно идентифицировали и описали специфический антиген-мишень Томорегулин (Tomoregulin) для РИТ при раке предстательной железы [44]. Первоначально поверхностная экспрессия данного маркера была подтверждена с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Используя лазерный сканирующий конфокальный микроскоп, была зафиксирована интернализация Томорегулина в клеточную мембрану. Изучение кинетики связывания Томорегулина с мышиными МАТ 2Н8, мечеными ¹²⁵I, выявило, что максимальное количество комплексов антиген – антитело выявляется через 90

мин после начала эксперимента. Взаимодействие Томорегулина с раковыми клетками подтвердило селективную цитотоксичность иммунокомплексов и сделало его новой мишенью для терапии рака предстательной железы.

Интересен опыт применения РИТ для лечения метастатической меланомы. Только в США ежегодно выявляется около 40 тыс. пациентов с меланомой, а во всем мире – около 100 тыс. человек. Пятилетняя выживаемость больных метастатической меланомой составляет 6 % [21]. Для лечения метастатической меланомы были разработаны моноклональные антитела к меланину 6D2 (IgM) и 11B11. Фармакокинетика МАТ меченных радиоактивным изотопом ^{188}Re была изучена на экспериментальной меланоме у голых мышей. Данные легли в основу клинических испытаний препарата ^{188}Re -PTI-6D2 [29].

Результаты одного проекта, находящегося на I/II фазе клинических испытаний, были опубликованы в 2008 г. [28]. Терапию препаратом ^{188}Re -PTI-6D2 провели 12 пациентам с метастатической меланомой IV стадии. Результаты сцинтиграфии и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) показали, что ^{188}Re -PTI-6D2 накапливается в значительном количестве в метастазах мягких тканей, но не в костях. Остальные органы при этом не получали большой лучевой нагрузки.

Другое клиническое испытание по РИТ препаратом ^{188}Re -PTI-6D2 проходило в Израиле и США [29]. В результате лечения 20 пациентов с метастатической меланомой была получена информация по биораспределению антител, меченных ^{188}Re , в организме человека. Показано, что ^{188}Re менее токсичен и более эффективен, чем другие изотопы, которые применяются сегодня. Таким образом, применение меченных ^{188}Re антимиеланиновых IgM при метастатической меланоме можно использовать в дальнейших иммунотерапевтических исследованиях.

Для лечения пациентов с метастазами солидных опухолей в головной мозг в Италии проводилась вторая фаза клинического испытания РИТ [11]. Оценивался терапевтический потенциал антител L19SIP, меченных ^{131}I , в сочетании с лучевой терапией. Гуманизированные антитела L19SIP способны связываться с эндотелием вновь образующихся сосудов, которые присутствуют у большинства видов агрессивных опухолей. Результаты

предыдущих I и II фаз клинических испытаний показали хорошую переносимость и безопасность данного вида РИТ. Предварительные результаты II фазы исследования еще не опубликованы в открытой печати.

Лечение с применением методов ядерной медицины в большинстве случаев проходит безболезненно; тем не менее иногда наблюдаются побочные эффекты. После РИТ увеличивается риск возникновения пролонгированной миелосупрессии, что может проявляться нейтропенией, лейкопенией и тромбоцитопенией. Как и при химио- или радиотерапии, это может приводить к кровотечениям или развитию инфекционных осложнений. Серьезные анафилактические и другие реакции гиперчувствительности были отмечены менее чем в 1 % случаев. Возможны проходящие аллергические реакции, лихорадка с ознобом, снижение артериального давления, кожная сыпь и диарея. Более редкими побочными эффектами при проведении РИТ является гипотиреоз (снижение функциональной активности щитовидной железы). Из побочных эффектов также описаны тошнота, головная боль, боль в животе и головокружение. В этом случае применяют симптоматическую терапию. У большинства пациентов вообще не возникало никаких побочных эффектов, что говорит о перспективности данного вида лечения.

В России первые исследования с использованием меченных радионуклидами противоопухолевых антител для диагностики и терапии солидных опухолей были проведены группой ученых из Института медицинской радиологии в 1986 г. [3, 4]. Результаты экспериментальных работ на животных с трансплантатами солидных опухолей были обнадеживающими и показали высокую специфичность взаимодействия меченных ^{131}I противоопухолевых антител с антигенами клеток-мишеней в сравнении с неспецифическими иммуноглобулинами, мечеными ^{125}I [4]. Концентрация противоопухолевых антител в ткани опухоли превышала в 7–10 раз содержание этих антител в нормальных тканях.

Новые мишени и стратегии для радиоиммунотерапии

Развитие агрессивных солидных опухолей и некоторых злокачественных лимфом напрямую зависит от образования новых кровеносных сосудов. Так как ангиогенез в норме практически отсутствует у здоровых людей, исключая женщин

репродуктивного возраста, множество подходов и терапевтических стратегий направлено на поиск мишеней во вновь образующихся сосудах и их блокировку. Ингибирование роста сосудов, кровоснабжающих опухоль, является основной целью направленной иммунотерапии [35].

В Цюрихе на базе небольшой биотехнологической компании, принадлежащей семье Нери (Neri), группа ученых получила новое mATF16, специфичное для сосудов злокачественных опухолей. Оно специфично для A1 домена адгезивного белка тенасцина-С, который обычно распределяется в матриксе эмбриональных тканей. Он участвует в таких процессах, как пролиферация и миграция клеток, и ассоциирован с изменениями в архитектуре тканей, которые происходят в процессе морфогенеза и эмбриогенеза, а также при онкогенезе или ангиогенезе. Моноклональное антитело к тенасцину было соединено с радиоактивным изотопом ^{131}I , который давно используется для лечения заболеваний щитовидной железы. Это соединение назвали Tenarad – конъюгат mAT F-16 с радиоизотопом ^{131}I . Есть и другие варианты такого препарата. Для лечения неходжкинских лимфом уже применяются Бексар (CD20- ^{131}I) и Зевалин (CD20- ^{90}Y). Другой конъюгат mAT к CD30 с цитостатиком MMAE (antimitotic agent monomethyl auristatin E) – препарат Brentuximab vedotin (Adcetris или SGN-35) – используют для терапии лимфомы Ходжкина и анапластической крупноклеточной лимфомы. В 2010 г. этой же группой ученых была разработана новая диагностическая технология по обнаружению ранних метастазов опухоли в регионарные лимфоузлы [33]. В её основе лежит визуализация лимфоангиогенеза с использованием mAT к эпитомам лимфатических сосудов, меченных ^{124}I , и позитрон-эмиссионной томографии.

Результаты первой фазы другого клинического испытания mAT к трансмембранному протеину эндотелия сосудов tTF (truncated tissue factor) были опубликованы в 2009 г. [16]. Ученые индуцировали тромбоз сосудов, кровоснабжающих солидные опухоли у мышей. Связав растворимую мутантную форму основного ингибитора коагуляции сосудов tTFc протеином NGR, удалось сохранить тромбогенную активность комплекса. На мышинной модели с перевиванием аденокарциномы человека (A549), меланомы (M21) и фибросаркомы (HT1080) на гистологических препаратах была показана

частичная или полная тромбогенная окклюзия сосудов опухоли. С помощью MPT обнаружили значительную редукцию опухолевой перфузии у людей. Направленный тромбоз сосудов опухоли, индуцированный tTF-NGR, может явиться новой стратегией лечения рака.

В России в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН ученые под руководством проф. С.М. Деева создали искусственные белковые соединения, которые способны целенаправленно доставлять радиоизотоп в опухоль [6, 7]. Их можно использовать как для диагностики, так и для терапии рака. Создаваемые соединения можно применять для лечения не одного вида, а групп раковых заболеваний, сходных по молекулярному портрету (имеющих на клеточной поверхности один и тот же маркер). Учёные работают с пятью опухолевыми антигенами. В качестве оптимальной мишени они рассматривают маркер HER2/neu, который встречается у самых распространённых злокачественных новообразований: рака молочной железы, яичника, предстательной железы, желудка, лёгких. Генно-инженерная часть исследований успешно завершена [23]. Для распознавания HER2/neu-антигена в лаборатории создали рекомбинантные гетеромультимерные наноантитела, которые имеют хорошие перспективы для последующего применения в медицинской практике. Для создания предложена новая стратегия, основанная на рибонуклеазе барназе и её природном ингибиторе барстаре. Эти два белка образуют исключительно прочный комплекс. Впервые модуль барназа-барстар использован также для создания дивалентных биспецифических мини-антител (425scFv-барстар/4D5scFv-барназа), одновременно распознающих два разных онкомаркера высокой клинической значимости: рецептор эпидермального ростового фактора человека HER1 (EGFR) и мембранный рецептор HER2/neu (ERBB2) [38]. На основе барназы и мини-антител к опухолевым маркерам EGFR и ERBB2 были созданы иммуноРНКазы, которым дали название иммунобарназные конъюгаты. Иммунобарназные конъюгаты scFv 425-барназа и scFv 4D5-дибарназа специфически связывались, соответственно, с рецепторами EGFR или ERBB2 на поверхности опухолевых клеток, интернализировались рецептор-опосредованным эндоцитозом и убивали клетки, вызывая в них апоптоз, при концентрациях, на три порядка меньших, чем барназа. На эксперимен-

тальной модели иммунодефицитных мышей также показано, что scFv 4D5-дибарназа ингибировала в мышах BALB/c *nude* рост привитых человеческих опухолей молочной железы, гиперэкспрессирующих ERBB2 и не оказывала серьезных побочных токсических эффектов на мышей BDF1 и BALB/c *nude*. Мультимерные мини-антитела сильнее связываются со своим антигеном, лучше накапливаются в опухолях и быстрее выводятся из организма [13, 24, 43]. В настоящее время ведутся испытания созданных соединений в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и МНИОИ им. П.А. Герцена.

Несколько групп ученых изучают поверхностную экспрессию и иммуносупрессивные свойства других высокополиморфных стресс-индуцированных молекул MICA и MICB [2, 8, 9]. Эти молекулы, родственные антигенам МНС класса I, были описаны в конце 90-х годов XX века [26]. На поверхности нормальных клеток они отсутствуют либо содержатся в незначительном количестве, однако их экспрессия может индуцироваться в условиях клеточного стресса, при вирусных или бактериальных инфекциях, а также многократно увеличиваться при злокачественной трансформации клеток. Можно предположить, что антигенные детерминанты MICA или MICB послужат хорошими мишенями для радиоиммунотерапии. Конъюгация МАТ к данным стресс-индуцированным молекулам с определенным радиоизотопом поможет в борьбе с рядом злокачественных и инфекционных заболеваний.

Заключение

Радиоиммунотерапия – это многообещающее направление на стыке радиологии и иммунологии. В мире в стадии разработки и предклинических исследований находятся различные радиоиммунопрепараты. Некоторые из них уже изучаются в клинических исследованиях. Радиоиммунотерапия пациентов с некоторыми лимфопролиферативными и распространенными солидными опухолями находится на I/II фазах исследования, т.к. сложно подобрать адекватные критерии оценки результатов терапии. Однако с каждым годом расширяется спектр мишеней и антигенных детерминант для РИТ. Перспективным направлением современной РИТ является изучение новых би- и три-специфических антител для лечения локализованных и небольших новообразований. Российские ученые занимаются созданием РФП и ищут пути увеличения активно-

сти таких препаратов и повышения их безопасности [5, 10]. Проводятся экспериментальные работы по оценке возможности применения РФП на основе противоопухолевых МАТ для РИТ некоторых видов опухолей [13, 38, 43].

Исследователи утверждают, что РИТ может помочь в лечении онкологических заболеваний, в том числе при диссеминации процесса, а также дает надежду на предотвращение заболеваний. Дальнейшее развитие ядерной медицины связано с разработкой и внедрением в широкую клиническую практику новых эффективных РФП, в том числе меченых антител и их фрагментов, рецептор-связывающих соединений, позитрон-излучающих радионуклидов, а также совершенствованием радиодиагностической аппаратуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абакушин Д.Н., Абакушина Е.В., Анохин Ю.Н. Поиск новых мишеней для радиоиммунотерапии онкологических заболеваний // Вопросы онкологии. 2013. Т. 59, № 3. Прил. № 3. Т. III. С. 1150.
2. Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г. Стресс-индуцированные молекулы MICA/B и их роль в развитии онкологических заболеваний // Молекулярная медицина. 2012. № 4. С. 16–20.
3. Анохин Ю.Н., Норец Т.А., Деденков А.Н. Моноклональные антитела в радионуклидной диагностике и терапии опухолевых заболеваний // Медицинская радиология. 1985. № 6. С. 72–78.
4. Анохин Ю.Н., Норец Т.А., Петрова Г.А., Ендолов В.В., Трофимова М.В., Новиков В.В. Избирательное накопление меченных ^{131}I -йодом моноклональных антител ИКО-1 в ткани мышинного лимфолейкоза L-1210 // Медицинская радиология. 1988. № 1. С. 31–33.
5. Анохин Ю.Н. Использование нанотехнологий и наноматериалов для визуализации и терапии злокачественных опухолей // Фундаментальные проблемы науки. М.: НИЯУ МИФИ, 2010. Т. 3. С. 221–224.
6. Глинка Е.М., Эдельвейс Э.Ф., Деев С.М. Эукариотические экспрессирующие векторы и иммуноконъюгаты для терапии рака // Биохимия. 2006. Т. 71, № 6. С. 742–753.
7. Деев С.М., Лебедево Е.Н. Инженерия антител: молекулярный конструктор на основе модуля барназа-барстар // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35, № 6. С. 761–778.
8. Коваленко Е.И., Абакушина Е.В., Климова А.В., Кузьмина Е.Г., Каневский Л.М. Иммунорегуляторные молекулы MICA в сыворотке крови онкологических больных // Злокачественные опухоли. 2012. Т. 2, № 2. С. 167.
9. Моисеенко В.М., Данилов А.О., Балдуева И.А., Данилова А.Б., Фахрутдинова О.Л. Иммунохимический анализ продукции MICA опухолевыми клетками, *in vitro* и *in vivo* в контексте создания и применения противоопухолевых вакцин // Вопросы онкологии. 2010. № 5. С. 576–582.
10. Сморызанова О.А., Новикова И.С., Скворцов В.Г., Подгородниченко В.К., Петруев В.М. Перспективы использования металлотиюнеина в качестве хелатирующего агента для разработки радиофармпрепаратов на основе ^{213}Bi // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2010. № 1. С. 44–49.
11. A Prospective non-randomized study of ^{131}I -L19SIP radioimmunotherapy in combination with whole brain radiation therapy in patients with multiple brain metastases from solid tumors. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01125085>
12. Adams G.P., Weiner L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer // Nat. Biotechnol. 2005. Vol. 23 (9). P. 1147–1157.

13. Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. Antitumor activity and toxicity of anti-HER2 immunorNase scFv 4D5-dibarnase in mice bearing human breast cancer xenografts // *Invest. New Drugs*. 2009. Vol. 29 (1). P. 22–32. doi: 10.1007/s10637-009-9329-2.
14. Behr T.M., Sharkey R.M., Juweid M.E., Dunn R.M., Ying Z., Zhang C.H., Siegel J.A., Goldenberg D.M. Variables influencing tumor dosimetry in radioimmunotherapy of CEA-expressing cancers with anti-CEA and antimucin monoclonal antibodies // *J. Nucl. Med.* 1997. Vol. 38. P. 409–418.
15. Behr T.M., Blumenthal R.D., Memtsoudis S., Sharkey R.M., Gratz S., Becker W., Goldenberg D.M. Cure of metastatic human colonic cancer in mice with radiolabeled monoclonal antibody fragments // *Clin. Cancer Res.* 2000. Vol. 6. P. 4900–4907.
16. Bieker R., Kessler T., Schwoppe C., Padry T., Persigehl T., Bremer C., Dreischalück J., Kolkmeier A., Heindel W., Mesters R.M., Berdel W.E. Infarction of tumor vessels by NGR-peptide-directed targeting of tissue factor: experimental results and first-in-man experience // *Blood*. 2009. Vol. 113 (20). P. 5019–5027. doi: 10.1182/blood-2008-04-150318.
17. Burvenich I., Schoonooghe S., Cornelissen B., Blanckaert P., Coene E., Cuvelier C., Mertens N., Slegers G. In vitro and In vivo targeting properties of Iodine-123- or Iodine-131 labeled monoclonal antibody 14C5 in a non small cell lung cancer and colon carcinoma model // *Clin. Cancer Res.* 2005. Vol. 11. P. 7288–7296.
18. Cheson B.D. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas // *Blood*. 2003. Vol. 101. P. 391–398.
19. Clarke K., Lee F.T., Brechbiel M.W., Smyth F.E., Old L.J., Scott A.M. In vivo biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice // *Cancer Res.* 2000. Vol. 60. P. 4804–4811.
20. Conti P.S., White C., Pieslor P., Molina A., Aussie J., Foster P. The role of imaging with (111)In-ibritumomab tiuxetan in the ibritumomab tiuxetan (zevalin) regimen: results from a Zevalin Imaging Registry // *J. Nucl. Med.* 2005. Vol. 46 (11). P. 1812–1818.
21. Dadachova E., Casadevall A. Renaissance of targeting molecules for melanoma // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2006. Vol. 21 (6). P. 545–552.
22. De Potter C.R., Schelfhout A.M., De Smet F.H., van Damme S., de Ridder L., Dhont E., van Emmelo J. A monoclonal antibody directed against a human cell membrane antigen prevents cell substrate adhesion and tumor invasion // *Am. J. Pathol.* 1994. Vol. 144. P. 95–103.
23. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. Design of multivalent complexes using the barnasebarstar module // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21. P. 1486–1492.
24. Goldenberg D.M., Rossi E.A., Sharkey R.M., McBride W.J., Chang C.H. Multifunctional antibodies by the Dock-and-Lock method for improved cancer imaging and therapy by pretargeting // *J. Nucl. Med.* 2008. Vol. 49 (1). P. 158–163.
25. Grillo-Lopez A.J. Zevalin: the first radioimmunotherapy approved for the treatment of lymphoma // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2002. Vol. 2. P. 485–493.
26. Groh V., Rhinehart R., Secrist H., Bauer S., Grabstein K.H., Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96. P. 6879–6884.
27. Kaminski M.S., Estes J., Zasady K.R., Francis I.R., Ross C.W., Tuck M., Regan D., Fisher S., Gutierrez J., Kroll S., Stagg R., Tidmarsh G., Wahl R.L. Radioimmunotherapy with iodide (131)I tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience // *Blood*. 2000. Vol. 96. P. 1259–1266.
28. Klein M., Shibli N., Friedmann N., Thornton G.B., Chisin R., Lotem M. Imaging of metastatic melanoma (MM) with a 188Rhenium (188Re)-labeled melanin binding antibody // *J. Nucl. Med.* 2008. Vol. 49. Suppl. 1. P. 52.
29. Klein M., Lotem M., Peretz T., Zwas S.T., Mizrachi S., Liberman Y., Chisin R., Schachter J., Ron I.G., Iosilevsky G., Kennedy J.A., Revskaya E., de Kater A.W., Banaga E., Klutzaritz V., Friedmann N., Galun E., Denardo G.L., Denardo S.J., Casadevall A., Dadachova E., Thornton G.B. Safety and efficacy of 188-rhenium-labeled antibody to melanin in patients with metastatic melanoma // *J. Skin Cancer*. 2013; 2013: 828329. doi: 10.1155/2013/828329. Epub 2013. Jan 10.
30. Kobayashi H., Shirakawa K., Kawamoto S., Saga T., Sato N., Hiraga A., Watanabe I., Heike Y., Togashi K., Konishi J., Brechbiel M.W., Wakasugi H. Rapid accumulation and internalization of radiolabeled herceptin an inflammatory breast cancer xenograft with vasculogenic mimicry predicted by the contrast-enhanced dynamic MRI with the macromolecular contrast agent G6-(1B4M-Gd)(256) // *Cancer Res.* 2002. Vol. 62. P. 860–866.
31. Koppe M.J., Bleichrodt R.P., Soede A.C., Verhofstad A.A., Goldenberg D.M., Oyen W.J., Boerman O.C. Biodistribution and therapeutic efficacy of 125/131I-, 186Re-, 88/90Y-, or 177Lu-labeled monoclonal antibody MN-14 to carcinoembryonic antigen in mice with small peritoneal metastases of colorectal origin // *J. Nucl. Med.* 2004. Vol. 45. P. 1224–1232.
32. Le Doussal J.M., Martin M., Gautherot E., Delaage M., Barbet J. In vitro and in vivo targeting of radiolabeled monovalent and divalent haptens with dual specificity monoclonal antibody conjugates: enhanced divalent hapten affinity murine model of adult T-cell leukemia with the alpha-emitting radionuclide, for cell-bound antibody conjugate // *J. Nucl. Med.* 1989. Vol. 30. P. 1358–1366.
33. Milenic D.E., Brady E.D., Brechbiel M.W. Antibody-targeted radiation cancer therapy // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. Vol. 3 (6). P. 488–499.
34. Nielsen U.B., Adams G.P., Weiner L.M., Marks J.D. Targeting of bivalent anti-erbB2 antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity // *Cancer Res.* 2000. Vol. 60. P. 6434–6440.
35. Palumbo A., Hauler F., Dziunycz P., Schwager K., Soltermann A., Pretto F., Alonso C., Hofbauer G.F., Boyle R.W., Neri D. A chemically modified antibody mediates complete eradication of tumours by selective disruption of tumour blood vessels // *Br. J. Cancer*. 2011. Vol. 104 (7). P. 1106–1115. doi: 10.1038/bjc.2011.78.
36. Phaeton R., Wang X.G., Einstein M.H., Goldberg G.L., Casadevall A., Dadachova E. The influence of proteasome inhibitor MG132, external radiation and unlabeled antibody on the tumor uptake and biodistribution of ¹⁸⁸Re-labeled anti-E6 C1P5 antibody in cervical cancer in mice // *Cancer*. 2010. Vol. 15 (116). Suppl. 4. P. 1067–1074. doi: 10.1002/cncr.24794.
37. Revskaya E., Jongco A.M., Sellers R.S., Howell R.C., Koba W., Guimaraes A.J., Nosanchuk J.D., Casadevall A., Dadachova E. Radioimmunotherapy of experimental human metastatic melanoma with melanin-binding antibodies and in combination with dacarbazine // *Clin. Cancer Res.* 2009. Vol. 15 (7). P. 2373–2379. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2376.
38. Serebrovskaya E.O., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Deyev S.M. Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. Vol. 106. P. 9221–9225. doi: 10.1073/pnas.0904140106.
39. Shimoni A., Avivi I., Rowe J.M., Yeshurun M., Levi I., Or R., Patashenko P., Avigdor A., Zwas T., Nagler A. A randomized study comparing yttrium-90 ibritumomab tiuxetan (Zevalin) and high-dose BEAM chemotherapy versus BEAM alone as the conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in patients with aggressive lymphoma // *Cancer*. 2012. Vol. 118 (19). P. 4706–4714. doi: 10.1002/cncr.27418.
40. Tomblyn M. Radioimmunotherapy for B-cell non-hodgkin lymphomas // *Cancer Control*. 2012. Vol. 19 (3). P. 196–203.
41. Witzig J.E. Zevalin (TM). Treatment of non-Hodgkin's lymphoma // *Drugs Future*. 2002. Vol. 27. P. 563–568.
42. Wu A.M., Senter P.D. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates // *Nat. Biotechnol.* 2005. Vol. 23 (9). P. 1137–1146.
43. Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. Self-assembling complexes of quantum dots and scFv antibodies for cancer cell targeting and imaging // *PLoS One*. 2012. Vol. 7 (10). e48248. doi: 10.1371/journal.pone.0048248.
44. Zhao X.Y., Liu H.L., Liu B., Willuda J., Siemeister G.,

Mahmoudi M., Dinter H. Tomoregulin Internalization Confers Selective Cytotoxicity of Immunotoxins on Prostate Cancer // *Cells Transl. Oncol.* 2008. Vol. 1. P. 102–109.

Поступила 24.04.14

REFERENCES

1. Abakushin D.N., Abakushina E.V., Anohin Ju.N. Search of new targets for a radio immunotherapy of oncological diseases // *Voprosy onkologii.* 2013. T. 59, № 3. Pril. № 3. T. III. P. 1150. [in Russian]
2. Abakushina E.V., Kuz'mina E.G. The stress-induced molecules of MICA/B and their role in development of oncological diseases // *Molekul-jarnaja medicina.* 2012. № 4. P. 16–20. [in Russian]
3. Anohin Ju.N., Norec T.A., Dedekov A.N. Monoclonal antibodies in radio nuclide diagnostics and therapy of cancer diseases // *Medicinskaja Radiologija.* 1986. №6. C. 72–78. [in Russian]
4. Anohin Ju.N., Norec T.A., Petrova G.A., Endolov V.V., Trofimova M.V., Novikov V.V. Opportunity in vivo radionuclide diagnostics of hematologic tumors by means of marked monoclonal antibodies // *Medicinskaja Radiologija.* 1988. № 1. C. 31–33. [in Russian]
5. Anohin Ju.N. The nanotechnologies and nanomaterials for visualization and therapy of malignant tumors // *Fundamentalniye problemy nauki.* M., 2010. Vol. 3. P. 221–224. [in Russian]
6. Glinka E.M., Jedel'veys Je.F., Deev S.M. The expressing vectors of eukaryot and immunocjugates for cancer therapy // *Biohimija.* 2006. T. 71, № 6. P. 742–753. [in Russian]
7. Deev S.M., Lebedenko E.N. Engineering of antibodies: the molecular designer on the basis of the module barnaza-barstar // *Bioorganicheskaja himija.* 2009. Vol. 71 (6). P. 761–778. [in Russian]
8. Kovalenko E.I., Abakushina E.V., Klinkova A.V., Kuz'mina E.G., Kanevskij L.M. Immunoregulatory molecules of MICA in serum of blood of oncological patients // *Zlokachestvennye opuholi.* 2012. T. 2, № 2. P. 167. [in Russian]
9. Moiseenko V.M., Danilov A.O., Balduva I.A., Danilova A.B., Fahrutdinova O.L. The immunochemical analysis of tumor cells production of MICA, in vitro and in vivo in a context of reparation and application of cancer vaccines // *Voprosy onkologii.* 2010. № 5. P. 576–582. [in Russian]
10. Smoryzanova O.A., Novikova I.S., Skvortov V.G., Podgorodnichenko V.K., Petriev V.M. Prospects for the use of metallothionein as a chelating agent for the development of radiopharmaceuticals based on ²¹³Bi // *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj TM farmaceuticheskoy himii.* 2010. № 1. C. 44–49. [in Russian]
11. A Prospective non-randomized study of ¹³¹I-L19SIP radioimmunotherapy in combination with whole brain radiation therapy in patients with multiple brain metastases from solid tumors. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01125085>
12. Adams G.P., Weiner L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer // *Nat. Biotechnol.* 2005. Vol. 23 (9). P. 1147–1157.
13. Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. Antitumor activity and toxicity of anti-HER2 immunoRNase scFv 4D5-dibarnase in mice bearing human breast cancer xenografts // *Invest. New Drugs.* 2009. Vol. 29 (1). P. 22–32. doi: 10.1007/s10637-009-9329-2.
14. Behr T.M., Sharkey R.M., Juweid M.E., Dunn R.M., Ying Z., Zhang C.H., Siegel J.A., Goldenberg D.M. Variables influencing tumor dosimetry in radioimmunotherapy of CEA-expressing cancers with anti-CEA and antimucin monoclonal antibodies // *J. Nucl. Med.* 1997. Vol. 38. P. 409–418.
15. Behr T.M., Blumenthal R.D., Memtsoudis S., Sharkey R.M., Gratz S., Becker W., Goldenberg D.M. Cure of metastatic human colonic cancer in mice with radiolabeled monoclonal antibody fragments // *Clin. Cancer Res.* 2000. Vol. 6. P. 4900–4907.
16. Bieker R., Kessler T., Schwoppe C., Padry T., Persigehl T., Bremer C., Dreischaltick J., Kolkmeier A., Heindel W., Mesters R.M., Berdel W.E. Infarction of tumor vessels by NGR-peptide-directed targeting of tissue factor: experimental results and first-in-man experience // *Blood.* 2009. Vol. 113 (20). P. 5019–5027. doi: 10.1182/blood-2008-04-150318.
17. Burvenich I., Schoonooghe S., Cornelissen B., Blanckaert P., Coene E., Cuvelier C., Mertens N., Slegers G. In vitro and In vivo targeting properties of Iodine-123- or Iodine-131 labeled monoclonal antibody 14C5 in a non small cell lung cancer and colon carcinoma model // *Clin. Cancer Res.* 2005. Vol. 11. P. 7288–7296.
18. Cheson B.D. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas // *Blood.* 2003. Vol. 101. P. 391–398.
19. Clarke K., Lee F.T., Brechbiel M.W., Smyth F.E., Old L.J., Scott A.M. In vivo biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice // *Cancer Res.* 2000. Vol. 60. P. 4804–4811.
20. Conti P.S., White C., Pieslor P., Molina A., Aussie J., Foster P. The role of imaging with (111)In-ibritumomab tiuxetan in the ibritumomab tiuxetan (zevalin) regimen: results from a Zevalin Imaging Registry // *J. Nucl. Med.* 2005. Vol. 46 (11). P. 1812–1818.
21. Dadachova E., Casadevall A. Renaissance of targeting molecules for melanoma // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2006. Vol. 21 (6). P. 545–552.
22. De Potter C.R., Schelfhout A.M., De Smet F.H., Van Damme S., de Ridder L., Dhont E., van Emmelo J. A monoclonal antibody directed against a human cell membrane antigen prevents cell substrate adhesion and tumor invasion // *Am. J. Pathol.* 1994. Vol. 144. P. 95–103.
23. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. Design of multivalent complexes using the barnasebarstar module // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21. P. 1486–1492.
24. Goldenberg D.M., Rossi E.A., Sharkey R.M., McBride W.J., Chang C.H. Multifunctional antibodies by the Dock-and-Lock method for improved cancer imaging and therapy by pretargeting // *J. Nucl. Med.* 2008. Vol. 49 (1). P. 158–163.
25. Grillo-Lopez A.J. Zevalin: the first radioimmunotherapy approved for the treatment of lymphoma // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2002. Vol. 2. P. 485–493.
26. Groh V., Rhinehart R., Secrist H., Bauer S., Grabstein K.H., Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96. P. 6879–6884.
27. Kaminski M.S., Estes J., Zasady K.R., Francis I.R., Ross C.W., Tuck M., Regan D., Fisher S., Gutierrez J., Kroll S., Stagg R., Tidmarsh G., Wahl R.L. Radioimmunotherapy with iodide (¹³¹I) tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience // *Blood.* 2000. Vol. 96. P. 1259–1266.
28. Klein M., Shibli N., Friedmann N., Thornton G.B., Chisin R., Lotem M. Imaging of metastatic melanoma (MM) with a ¹⁸⁸Rhenium (¹⁸⁸Re)-labeled melanin binding antibody // *J. Nucl. Med.* 2008. Vol. 49. Suppl. 1. P. 52.
29. Klein M., Lotem M., Peretz T., Zwas S.T., Mizrahi S., Liberman Y., Chisin R., Schachter J., Ron I.G., Iosilevsky G., Kennedy J.A., Revskaya E., de Kater A.W., Banaga E., Klutzaritz V., Friedmann N., Galun E., Denardo G.L., Denardo S.J., Casadevall A., Dadachova E., Thornton G.B. Safety and efficacy of ¹⁸⁸-rhenium-labeled antibody to melanin in patients with metastatic melanoma // *J. Skin Cancer.* 2013; 2013: 828329. doi: 10.1155/2013/828329. Epub 2013 Jan 10.
30. Kobayashi H., Shirakawa K., Kawamoto S., Saga T., Sato N., Hiraga A., Watanabe I., Heike Y., Togashi K., Konishi J., Brechbiel M.W., Wakasugi H. Rapid accumulation and internalization of radiolabeled herceptin an inflammatory breast cancer xenograft with vasculogenic mimicry predicted by the contrast-enhanced dynamic MRI with the macromolecular contrast agent G6-(1B4M-Gd)(256) // *Cancer Res.* 2002. Vol. 62. P. 860–866.
31. Koppe M.J., Bleichrodt R.P., Soede A.C., Verhofstad A.A., Goldenberg D.M., Oyen W.J., Boerman O.C. Biodistribution and therapeutic efficacy of ¹²⁵I/131I-, ¹⁸⁶Re-, ⁸⁸Y-, or ¹⁷⁷Lu-labeled monoclonal antibody MN-14 to carcinoembryonic antigen in mice with small peritoneal metastases of colorectal origin // *J. Nucl. Med.* 2004. Vol. 45. P. 1224–1232.
32. Le Doussal J.M., Martin M., Gautherot E., Delaage M., Barbet J. In vitro and in vivo targeting of radiolabeled monovalent and divalent haptens with dual specificity monoclonal antibody conjugates: enhanced divalent hapten affinity murine model of adult T-cell leukemia with the

alpha-emitting radionuclide, for cell-bound antibody conjugate // J. Nucl. Med. 1989. Vol. 30. P. 1358–1366.

33. Milenic D.E., Brady E.D., Brechbiel M.W. Antibody-targeted radiation cancer therapy // Nat. Rev. Drug Discov. 2004. Vol. 3 (6). P. 488–499.

34. Nielsen U.B., Adams G.P., Weiner L.M., Marks J.D. Targeting of bivalent anti-erbB2 antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity // Cancer Res. 2000. Vol. 60. P. 6434–6440.

35. Palumbo A., Hauler F., Dziunycz P., Schwager K., Soltermann A., Pretto F., Alonso C., Hofbauer G.F., Boyle R.W., Neri D. A chemically modified antibody mediates complete eradication of tumours by selective disruption of tumour blood vessels // Br. J. Cancer. 2011. Vol. 104 (7). P. 1106–1115. doi: 10.1038/bjc.2011.78.

36. Phaeton R., Wang X.G., Einstein M.H., Goldberg G.L., Casadevall A., Dadachova E. The influence of proteasome inhibitor MG132, external radiation and unlabeled antibody on the tumor uptake and biodistribution of ^{188}Re -labeled anti-E6 C1P5 antibody in cervical cancer in mice // Cancer. 2010. Vol. 15 (116). Suppl. 4. P. 1067–1074. doi: 10.1002/cncr.24794.

37. Revskaya E., Jongco A.M., Sellers R.S., Howell R.C., Koba W., Guimaraes A.J., Nosanchuk J.D., Casadevall A., Dadachova E. Radioimmunotherapy of experimental human metastatic melanoma with melanin-binding antibodies and in combination with dacarbazine // Clin. Cancer Res. 2009. Vol. 15 (7). P. 2373–2379. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2376.

38. Serebrovskaya E.O., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Deyev S.M. Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. Vol. 106. P. 9221–9225. doi: 10.1073/pnas.0904140106.

39. Shimoni A., Avivi I., Rowe J.M., Yeshurun M., Levi I., Or R., Patachenko P., Avigdor A., Zwas T., Nagler A. A randomized study comparing yttrium-90 ibritumomab tiuxetan (Zevalin) and high-dose BEAM chemotherapy versus BEAM alone as the conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in patients with aggressive lymphoma // Cancer. 2012. Vol. 118 (19). P. 4706–4714. doi: 10.1002/cncr.27418.

40. Tomblyn M. Radioimmunotherapy for B-cell non-hodgkin lymphomas // Cancer Control. 2012. Vol. 19 (3). P. 196–203.

41. Witzig J.E. Zevalin™. Treatment of non-Hodgkin's lymphoma // Drugs Future. 2002. Vol. 27. P. 563–568.

42. Wu A.M., Senter P.D. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates // Nat. Biotechnol. 2005. Vol. 23 (9). P. 1137–1146.

43. Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. Self-assembling complexes of quantum dots and scFv antibodies for cancer cell targeting and imaging // PloS One. 2012. Vol. 7 (10). E48248. doi: 10.1371/journal.pone.0048248.

44. Zhao X.Y., Liu H.L., Liu B., Willuda J., Siemeister G., Mahmoudi M., Dinter H. Tomoregulin Internalization Confers Selective Cytotoxicity of Immunotoxins on Prostate Cancer // Cells Transl. Oncol. 2008. Vol. 1. P. 102–109.

РАК МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ: ВОЗМОЖНОСТИ ВЫСОКОПОЛЬНОЙ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Е.Г. Григорьев, И.Г. Фролова, Е.А. Усынин, С.А. Величко, В.В. Окунев,
А.В. Гольдберг

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск
634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: adresprostoy@gmail.com

Представлены современные возможности метода магнитно-резонансной томографии в диагностике, оценке степени инвазии и местной распространенности рака мочевого пузыря.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, магнитно-резонансная томография.

ROLE OF HIGH-FIELD MAGNETIC RESONANCE IMAGING IN DIAGNOSIS OF BLADDER CANCER (LITERATURE REVIEW)

E.G. Grigoryev, I.G. Frolova, E.A. Usynin, S.A. Velichko, V.V. Okunev, A.V. Goldberg
Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk
5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia, e-mail: adresprostoy@gmail.com

The role of high-field magnetic resonance imaging in diagnosis and assessment of invasion and local spread of bladder cancer has been presented.

Key words: bladder cancer, magnetic resonance imaging.

Ежегодно в мире раком мочевого пузыря (РМП) заболевают 335,8 тыс. человек и 132,4 тыс. умирает от этого тяжелого заболевания. По данным официальной статистики Минздрава РФ, заболеваемость раком мочевого пузыря постоянно увеличивается, за период с 2001 по 2011 г. прирост больных с РМП составил 8,88 %, стандартизованные показатели (на 100000 населения) возросли с 5,31 до 5,69 [8, 17]. Смертность от РМП в России превышает мировой показатель на 19,8 % [3, 7, 12]. У мужчин опухоли мочевого пузыря встречаются в 3–4 раза чаще, чем у женщин [11, 18]. Новообразования мочевого пузыря в большинстве случаев имеют эпителиальное происхождение, включая переходноклеточную карциному (более 90 %), плоскоклеточный рак (6–8 %), аденокарциному (2 %). Недифференцированный рак наблюдается менее чем в 1 % [2, 31].

Основным звеном патогенеза РМП считается прямой длительный контакт уротелия с мочой, содержащей экскретируемые канцерогенные вещества [11, 12]. Этот факт отражается в склонности уротелиального рака к множественному поражению, с вовлечением как мочевого пузыря, который имеют до 30–35 % больных, так и верхних мочевых путей [22, 29].

Стоит отметить, что только у 45 % больных РМП диагностируется на ранней стадии. В России доля больных с поверхностной формой рака (I стадия) составляет 20–30 %, в то время как за рубежом этот показатель достигает 80 %. При этом частота ошибок при определении стадии заболевания достигает 73 % [1]. Поэтому своевременная диагностика и лечение больных раком мочевого пузыря остаются актуальной проблемой современной онкологии. Известно, что адекватное определение степени мышечной инвазии дает возможность определить прогноз и целесообразность хирургического лечения. Большинство случаев (70–80 %) впервые выявленного РМП составляют поверхностные (немышечноинвазивные) опухоли. Поверхностный РМП, без инвазии мышечного слоя ($\leq T_1$), возможно лечить с помощью трансуретральной резекции (ТУР), в том числе с внутривезикальным введением цитостатиков. Частота рецидивов при поверхностном РМП достигает 50–90 %, при этом возрастает частота развития мышечноинвазивного рака. Инвазия опухоли в мышечный слой стенки пузыря приводит к снижению выживаемости. При мышечноинвазивных опухолях ($\geq T_{2a}$), как правило, необходимо выполнять радикальную цистэктомию

(T_{2a-3a}) с тазовой лимфодиссекцией или паллиативную химиолучевую терапию (T_{3b-4b}) [19, 30].

Комплекс методов лучевой диагностики при РМП включает ультразвуковое исследование, рентгенологические методики, компьютерную и магнитно-резонансную томографию [3, 4, 13, 15]. Магнитно-резонансная томография (МРТ) является диагностическим методом, сочетающим в себе преимущества пространственного и контрастного разрешения с отсутствием лучевой нагрузки. Метод позволяет локализовать, оценить количество и размеры образований мочевого пузыря, состояние перивезикальной клетчатки, окружающих структур, брюшной стенки и лимфоузлов. МРТ позволяет разграничить инвазивные и неинвазивные формы рака мочевого пузыря, уточняя распространенность опухоли и вовлеченность в процесс окружающих органов. Большинство авторов отмечена высокая точность метода – до 85 % [3, 6, 9]. Точность МРТ в стадировании РМП варьирует от 73 до 96 %, что на 10–33 % выше, чем при КТ-стадировании [19].

Методом выбора для первичной диагностики рака мочевого пузыря, оценки эффективности лечения и выявления рецидивов является МРТ с поверхностными фазированными катушками с помощью МР-систем, напряженностью магнитного поля 1,5 Тесла. Данное сочетание позволяет в большинстве случаев добиться высокого пространственного разрешения, адекватного поля обзора и визуализации структур менее 1–2 мм [14]. За последнее десятилетие показаны возможности повышения точности диагностики с применением эндоректальной катушки. Применение данной методики повышает возможность дифференциации подслизистого и мышечного слоев стенки пузыря, преодолевая недостаточное пространственное разрешение и малые значения параметра сигнал/шум [30].

Появление в клинической практике МР-томографов с напряженностью поля ≥ 3 Тесла привело к осуществлению еще более быстрых последовательностей с высоким разрешением. Использование 3Т сканера примерно соответствует по качеству изображения применению эндоректальной катушки на системах 1,5 Т, с лучшим комфортом для пациента. Сочетание 3Т сканера и трансректального датчика, вероятно, обеспечивает получение наибольшего количества информации и качественной дифференцировки отдельных

слоев мочевого пузыря. Однако применение исследований в таком сочетании пока ограничено по объективным причинам, и большинство сообщений о методах диагностики РМП основано на применении 1,5Т-томографов [30]. В клинической практике широко используются аппараты с низкой напряженностью магнитного поля (до 0,5 Тесла), которые в меньшей степени провоцируют проявление клаустрофобии. В то же время у данных аппаратов более долгое время сканирования, ограниченный набор протоколов динамических (быстрых) импульсных последовательностей и отсутствуют диффузионно-взвешенные протоколы. Тем не менее низкопольная МРТ обладает высокой эффективностью в диагностике новообразований, превосходит трансабдоминальное УЗИ и КТ в выявлении и стадировании опухолей мочевого пузыря, обладает преимуществами, которые характерны для метода МРТ в целом [16].

Кроме высокой разрешающей способности, важным преимуществом метода МРТ является применение почечно-экскретируемых контрастных веществ, не имеющих нефротоксичности. Внедряются быстрые импульсные последовательности, которые позволяют проводить качественные исследования с динамическим контрастированием.

Большинство уротелиальных опухолей располагается в основании мочевого пузыря (до 80 % при первичном РМП), в 30–40 % случаев они множественные, и более чем половина имеет размер менее 25 мм [39].

При обширном спектре возможностей современных сканеров протокол МРТ в оценке опухоли мочевого пузыря в большинстве случаев сводится к применению следующих последовательностей: T2 взвешенные изображения в двух перпендикулярных проекциях, как правило аксиальной и сагиттальной (повышенной информативностью обладают T2-ВИ высокого разрешения, ориентированных перпендикулярно к стенке мочевого пузыря в основании опухоли); T2 взвешенные изображения с программой «подавления» сигнала от жировой ткани для оценки распространения опухоли за пределы стенки пузыря; T1 взвешенные изображения всего таза, предпочтительно в аксиальной плоскости, которые помогают выявить экстравезикальную инфильтрацию, лимфоаденопатию, вовлечение костных структур [3, 19, 20, 34, 37, 39]. Внутреннее контрастирование препаратами гадолиния

с оценкой динамики накопления парамагнетика помогает в оценке инвазивного компонента опухоли. После введения контраста последовательность T1 используется в двух проекциях.

МР-семиотика уротелиальной опухоли зависит в основном от размера, выраженности инвазивного компонента, наличия так называемого сосудистого «стебля» (stalk) [29, 36]. На T1 взвешенных изображениях интенсивность МР-сигнала опухоли варьирует от низкой до средней, подобной сигналу стенки мочевого пузыря на фоне гипоинтенсивной мочи и гиперинтенсивной перивезикальной клетчатки [37]. На T2 взвешенных изображениях опухоль имеет изоинтенсивный сигнал, чуть более яркий, чем мышечный слой мочевого пузыря, соответственно более низкий относительно гиперинтенсивной мочи. При сохранной низкой интенсивности мышечного слоя предполагается наличие неинвазивной опухоли (стадии T_a или T_1). Исследователи сходятся во мнении, что по данным МРТ невозможно дифференцировать данные смежные стадии [37, 38]. Когда нормальный низкий сигнал мышечной стенки мочевого пузыря прерывается сигналом промежуточной интенсивности, предполагается мышечно-инвазивная опухоль (стадия T_2) [37]. Многие авторы сообщают о высокой точности МРТ в оценке глубины интрамуральной инвазии – до 96 % при использовании надлежащей техники [27, 28].

Распространение сигнала более низкой интенсивности (соответствует мягкотканой) в перивезикальную клетчатку может быть выявлено по T1- и T2-взвешенным изображениям, что позволяет предположить стадию заболевания, соответствующую T_3 . При этом, по мнению большинства авторов, микроскопическое экстрапузырное распространение (T_{3a}) не может быть достоверно идентифицировано [10]. Поражение стенки мочевого пузыря с нечеткой, неровной внешней границей и наличием продолговатых участков повышенной интенсивности, идентичной сигналу опухоли в перивезикальной клетчатке, является признаком стадии T_{3b} [37]. Распространение опухоли в перивезикальную клетчатку сопровождается уменьшением интенсивности сигнала клетчатки на T1-ВИ, в том числе поэтому при оценке распространения опухоли за пределы стенки пузыря используются протоколы с подавлением сигнала от жировой ткани [3].

Во литературных источниках отмечается распространенная ошибка в оценке местного распространения РМП, с завышением стадии заболевания из-за наличия признаков воспаления (при постбиопсийных изменениях), фиброза и грануляций, имитирующих перивезикальную инвазию, особенно часто после трансуретральной резекции [28].

При контрастировании на динамических сканах опухоль демонстрирует более интенсивное повышение МР-сигнала, чем нормальная стенка мочевого пузыря или постбиопсийные изменения [39]. Мышечный слой стенки мочевого пузыря дольше, чем ткань опухоли, остается гипоинтенсивным на T1-ВИ, что позволяет более четко дифференцировать слизистый и мышечный слои и, соответственно, с большой точностью определять распространение патологического процесса в данных слоях стенки мочевого пузыря [3, 20]. Послеоперационные изменения могут в течение длительного времени симулировать или, наоборот, маскировать рецидив опухоли. При использовании контрастного усиления возрастает точность диагностического исследования при определении минимального роста рецидивной опухоли в послеоперационном периоде [39].

МРТ является предпочтительной методикой в оценке вовлечения близлежащих органов и структур, включая простату у мужчин, матку и влагалище у женщин, брюшную стенку. Мультиплоскостные T2-ВИ и постконтрастные T1-ВИ обеспечивают в таких случаях самые информативные сканы [20].

Мнения исследователей расходятся относительно четкого разделения РМП по стадиям (T_1 или T_{2a}) с помощью МРТ: точность выявления стадии процесса с помощью МРТ, по разным данным, составляет от 75 до 85 %. Необходимо отметить, что возможности МРТ в диагностике опухолей увеличиваются при размерах опухоли более 10 мм в диаметре. Таким образом, эффективность МРТ в диагностике рака с признаками инвазии выше, чем при КТ и трансабдоминальном УЗИ. Информативность МРТ не столь высока при малых размерах РМП, не распространяющихся на мышечный слой. Тем не менее из-за высокой мягкотканой контрастности, чувствительность и положительная прогностическая ценность МРТ составляет более 90 % [3]. Большинство авторов признают более широкие возможности МРТ в стадировании рака мочевого пузыря, точность

варьирует в рамках 62–85 % против 50–55 % по данным КТ [28, 33, 37].

Точность МРТ в определении метастатического поражения лимфоузлов, основанная на критерии размера, колеблется от 73 до 90 % [20, 28]. Важным является размер выявленных лимфатических узлов, измеренный по короткой оси. Помимо размера имеет значение их форма. При округлой форме лимфатического узла заподозрить метастатический характер изменений можно при размере от 8 мм и более, при овоидной форме – от 10 мм и больше. Однако в узлах, имеющих нормальный размер, не исключается наличие микрометастазов. Применение методики с внутривенным введением ferumoxtran-10 с микрочастицами железа позволит улучшить показатели диагностики: чувствительность – до 96 %; специфичность – до 95 %; отрицательную прогностическую ценность – до 98 %. Препарат захватывается макрофагами, что приводит к потере сигнала в нормальных лимфатических узлах на T2-ВИ изображениях в отличие от пораженных лимфоузлов [24, 25, 30, 35].

В последнее время большое значение приобретает применение в протоколе МР-исследования диффузионно-взвешенных изображений (ДВИ). T2-ВИ и ДВИ являются отличными методиками в МРТ-визуализации и сопоставимы в обнаружении опухоли мочевого пузыря. При этом ДВИ превосходит T2-взвешенные изображения в установлении факта глубокой инвазии стенки пузыря, эта разница статистически значима. Обе методики сравнимы по оценке перивезикальной инфильтрации опухоли. При этом завышение T-стадии локализованной опухоли является наиболее частой ошибкой, наблюдаемой с применением T2-ВИ без ДВИ [23].

При диффузионной МРТ возможно определить количественный показатель – измеряемый коэффициент диффузии (ИКД). Величина ИКД участка стенки мочевого пузыря, пораженного раком, ниже, чем у неизменной стенки пузыря [26]. Использование ДВИ, по данным литературы, демонстрирует высокую диагностическую ценность при раке мочевого пузыря, а также хорошую воспроизводимость. Показана объективность данного протокола и совпадение заключений нескольких специалистов по результатам проведенного МР-исследования. Кроме того, числовое значение ИКД, по данным авторов, может потенциально служить биомаркером, указывая на клиническую агрессивность при раке

мочевого пузыря [29, 36]. В исследовании показана обратная корреляция значений ИКД и гистологической градации, а также степени инвазии опухоли (значение T), соответственно предложено расценивать ограничение диффузии ниже $0,921 \times 10^{-3} \text{ мм}^2/\text{с}$ в качестве показателя агрессии опухоли и большей степени инвазии, если изменения наблюдаются в области мышечной стенки мочевого пузыря.

Рядом авторов определены границы диагностических возможностей в зависимости от размера опухоли по данным ДВИ. С помощью дискриминантного анализа выявлено, что уровень чувствительности методики составляет 99 % в обнаружении рака мочевого пузыря при диаметре изменений 7 мм и более. В целом чувствительность ДВИ в обнаружении рака мочевого пузыря составляла до 92,3%, что превышает возможности T2-ВИ. С помощью МР-томографии проводятся исследования по оценке изменения структуры опухоли в процессе химиотерапии [32].

Получают развитие магнитно-резонансная урография и цистоскопия, которые чувствительны к выявлению опухолей более 10 мм. Данные методики, в том числе без контрастирования, применяются, как правило, для улучшения восприятия визуальной информации. Они позволяют выявить опухоль в зонах, труднодоступных для визуализации при рутинной цистоскопии вследствие определенной ригидности оптических волокон цистоскопа, ограничивающей угол обзора и возможность биопсии. МР-цистоскопия может играть вспомогательную роль при наличии ограничений или противопоказаний для инструментальной цистоскопии (например, стриктура уретры, некоторые виды дивертикулов мочевого пузыря). С помощью постпроцессорной обработки полученных изображений возможно выполнение виртуальной МР-цистоскопии [5, 35, 40].

Кроме определенных преимуществ МРТ в оценке мочевой системы, таких как возможность исследования пациентов с нарушенной почечной функцией, отсутствие лучевой нагрузки, существуют и недостатки метода. Они включают ограниченные возможности в обнаружении кальцинатов и воздуха, применение у пациентов с гематурией, относительно низкое пространственное разрешение по сравнению с СКТ. Также относительным недостатком МРТ является длительность сканирования [22]. Однако с появлением новых МР-

последовательностей, более быстрых, с высокой скоростью и лучшим пространственным разрешением, качество МРТ и вспомогательных методик (МР-урографии) значительно улучшается.

Учитывая вышеизложенное, стоит отметить преимущество МРТ в связи с отсутствием лучевой нагрузки и достаточно высокой точностью в диагностике поверхностного РМП. Применение МРТ при инвазивных формах рака мочевого пузыря позволяет более точно, чем СКТ, УЗИ и цистоскопия, определить прорастание мышечного слоя мочевого пузыря и вовлечение околопузырной клетчатки [3, 21]. Подтверждение наличия опухоли в мочевом пузыре – необходимое, но не достаточное условие для планирования лечения. Тщательный анализ томограмм и применение полноценного протокола МР-исследования, включающего ДВИ и динамическое контрастирование, обеспечивают наиболее полную информацию о структуре опухоли, глубине инвазии стенки мочевого пузыря, наличии регионарных и/или отдалённых метастазов. Однако, несмотря на развитие новых методик, проблема ранней диагностики и определения стадии РМП по-прежнему остается актуальной.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анолихин О.И., Сивков А.В., Бешлиев Д.А., Солнцева Т.В., Комарова В.А. Анализ уронефрологической заболеваемости в РФ по данным официальной статистики // Экспериментальная и клиническая урология. 2010. № 1. С. 4–11.
2. Воробьев А.В. Классификация и диагностика рака мочевого пузыря, вопросы дифференциальной диагностики // Практическая онкология. 2003. Т. 4, № 4. С. 196–203.
3. Глыбочко П.В., Зуев В.В., Попков В.М., Чехонацкая М.Л., Понукалин А.Н. Возможности лучевых методов исследования в диагностике рака мочевого пузыря // Саратовский научно-медицинский журнал. 2011. Т. 7, № 1. С. 148–151.
4. Григорьев Е.Г., Фролова И.Г., Усынин Е.А., Величко С.А., Окунев В.В. Рак мочевого пузыря: возможности лучевых методов диагностики (обзор литературы) // Сибирский онкологический журнал. 2013. № 3. С. 75–81.
5. Григорьев Е.Г., Фролова И.Г., Усынин Е.А. Магнитно-резонансная томография в диагностике рака мочевого пузыря // Материалы II съезда врачей лучевой диагностики СФО «Достижения современной лучевой диагностики в клинической практике». Бюллетень сибирской медицины, 2012. № 5 (Приложение). С. 41–43.
6. Громов А.И., Буйлов В.М. Лучевая диагностика и терапия в урологии: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 544 с.
7. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2004 г. // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2006. Т.17, № 3 (Приложение 1). С. 78–101.
8. Злокачественные новообразования в России в 2011 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2013. 288 с.
9. Каприн А.Д., Костин А.А. Современные возможности диагностики и лечения больных раком мочевого пузыря // Лечащий врач: Журнал для практикующего врача. 2003. № 7. С. 40–44.
10. Классификация злокачественных опухолей TNM. 6-е изд. / Под ред. Н.Н. Блинова. СПб.: Эскулап. 2003. 244 с.
11. Коробкин А.С., Терновой С.К., Пушкарь Д.Ю. Комплексная диагностика рака мочевого пузыря // REJR. 2012. Т. 2, № 4. С. 74–78.
12. Пушкарь Д.Ю., Говоров А.В., Матвеев В.Б. Эпидемиология рака мочевого пузыря // Пленум правления Российского общества урологов. Нижний Новгород, 2009. С. 280–286.
13. Строкова Л.А. Лучевая диагностика рака мочевого пузыря: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009. 38 с.
14. Усова А.В., Фролова И.Г., Афанасьев С.Г., Тарасова А.С. Возможности МРТ в диагностике и оценке эффективности лечения рака прямой кишки // Сибирский онкологический журнал. 2012. № 5(47). С. 74–80.
15. Харченко В.П., Котляров П.М., Каприн А.Д. Рак мочевого пузыря – основные принципы и возможности лучевой диагностики // Невский радиологический форум «Новые горизонты». СПб., 2007. С. 332–335.
16. Чернышев И.В., Луценко П.Е., Буланова Т.В. Возможности низкочастотной магнитно-резонансной томографии в диагностике новообразований мочевого пузыря // Онкоурология. 2010. № 1. С. 16–20.
17. Чойнзонов Е.Л., Писарева Л.Ф., Бояркина А.П., Одинцова И.Н., Тахауов Р.М. Онкологическая заболеваемость населения Томской области. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. 253 с.
18. Чойнзонов Е.Л., Писарева Л.Ф., Чердынцева Н.В., Бояркина А.П., Одинцова И.Н., Мартынова Н.А. Заболеваемость злокачественными новообразованиями в регионе Сибири и Дальнего Востока. Состояние онкологической службы и пути ее улучшения // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. 2004. № 2. С. 41–47.
19. Шавладзе З.Н., Березовская Т.П., Неледов Д.В., Шавладзе Н.З. Проспективная оценка эффективности магнитно-резонансной томографии с контрастным усилением в определении местного распространения рака мочевого пузыря // РАДИОЛОГИЯ-ПРАКТИКА. 2012. № 6. С. 40–48.
20. Bassi P.-F., Pagano F. Invasive Bladder Cancer. Springer-Verlag, London Limited, 2007. 303 p.
21. Beyersdorff D., Zhang J., Sehoder H., Bochner B., Hricak H. Bladder cancer: can imaging change patient management? // Curr. Opin. Urol. 2008. Vol. 18 (1). P. 98–104.
22. Browne R.F., Meehan C.P., Colville J., Power R., Torreggiani W.C. Transitional cell carcinoma of the upper urinary tract: spectrum of imaging findings // Radiographics. 2005. Vol. 25 (6). P. 1609–1627.
23. El-Assmy A., Abou-El-Ghar M.E., Mosbah A., El-Nahas A.R., Refaie H.F., Hekal I.A., El-Diasty T., Ibrahim H. Bladder tumour staging: comparison of diffusion- and T2-weighted MR imaging // Eur. Radiol. 2009. Vol. 19. P. 1575–1581. doi: 10.1007/s00330-009-1340-7.
24. Fortuin A.S., Deserno W.M., Meijer H.J., Jager G.J., Takahashi S., Debats O.A., Reske S.N., Schick C., Krause B.J., van Oort I., Witjes A.J., Hoogeveen Y.L., van Lin E.N., Barentsz J.O. Value of PET/CT and MR lymphography in treatment of prostate cancer patients with lymph node metastases // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2012. Vol. 84. P. 712–718. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.12.093.
25. Hansel D.E. (ed.). The Urinary Tract: A Comprehensive Guide to Patient Diagnosis and Management // Springer Science + Business Media, New York, 2012. P. 98–99.
26. Kilicksmez O., Cimilli T., Inci E., Kayhan A., Bayramoglu S., Tasdelen N., Gurmen N. Diffusion-weighted MRI of urinary bladder and prostate cancers // Diagn. Interv. Radiol. 2009. Vol. 15. P. 104–110.
27. Kim J.K., Park S.Y., Ahn H.J., Kim C.S., Cho K.S. Bladder cancer: analysis of multidetector row helical CT enhancement pattern and accuracy in tumor detection and perivesical staging // Radiology. 2004. Vol. 231 (3). P. 725–731.
28. Kim B., Semelka R.C., Ascher S.M., Chalpin D.B., Carroll P.R., Hricak H. Bladder tumor staging: comparison of contrast-enhanced CT, T1- and T2-weighted MR imaging, dynamic gadolinium-enhanced imaging, and late gadolinium-enhanced imaging // Radiology. 2004. Vol. 193 (1). P. 239–245.

29. Kobayashi S., Koga F., Yoshida S., Masuda H., Ishii C., Tanaka H., Komai Y., Yokoyama M., Saito K., Fujii Y., Kawakami S., Kihara K. Diagnostic performance of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in bladder cancer: potential utility of apparent diffusion coefficient values as a biomarker to predict clinical aggressiveness // *Eur. Radiol.* 2011. Vol. 21. P. 2178–2186. doi: 10.1007/s00330-011-2174-7.
30. Lee C.T., Wood D.P. Current Clinical Urology: Bladder Cancer. Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC, 2010.
31. Murphy W.M., Grignon D.J., Perlman E.J. Tumors of the kidney, bladder, and related urinary structures. Am. Registry of Pathology Washington, DC, 2004. 394 p.
32. Nishimura K., Fujiyama C., Nakashima K., Satoh Y., Tokuda Y., Uozumi J. The effects of neoadjuvant chemotherapy and chemo-radiation therapy on MRI staging in invasive bladder cancer: comparative study based on the pathological examination of whole layer bladder wall // *Int. Urol. Nephrol.* 2009. Vol. 41. P. 869–875. doi: 10.1007/s11255-009-9566-5.
33. Reimer P., Parizel P., Meaney J. et al. Clinical MR Imaging. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2010.
34. Reiser R.F., Semmler W., Hricak H. et al. Magnetic Resonance Tomography. Springer, 2008.
35. Saksena M.A., Dahl D.M., Harisinghani M.G. New imaging modalities in bladder cancer // *World J. Urol.* 2006. P. 473–480.
36. Takeuchi M., Sasaki S., Ito M., Okada S., Takahashi S., Kawai T., Suzuki K., Oshima H., Hara M., Shibamoto Y. Urinary bladder cancer: diffusion-weighted MR imaging – accuracy for diagnosing T stage and estimating histologic grade // *Radiology.* 2009. 251. P. 112–121. doi: 10.1148/radiol.2511080873.
37. Tekes A., Kamel I., Imam K., Szarf G., Schoenberg M., Nasir K., Thompson R., Bluemke D. Dynamic MRI of bladder cancer: evaluation of staging accuracy // *AJR.* 2005. Vol. 184 (1). P. 121–127.
38. Tillou X., Grardel E., Fourmarier M., Bernasconi T., Demailly M., Hakami F., Saint F., Petit J. Can MRI be used to distinguish between superficial and invasive transitional cell bladder cancer? // *Prog. Urol.* 2008. Vol. 18 (7). P. 440–444. doi: 10.1016/j.purol.2008.04.019.
39. Wong-You-Cheong J.J., Woodward P.J., Manning M.A., Davis C.J. From the Archives of the AFIP: neoplasms of the urinary bladder: radiologic-pathologic correlation // *Radiographics.* 2006. Vol. 26 (2). P. 553–580.
40. Yekeler E., Suleyman E., Dursun M., Zorba U.O., Tunc M., Tunaci A., Acunas B. Bladder tumors: virtual MR cystoscopy // *Abdom. Imaging.* 2006. Vol. 31. P. 483–489.
41. Cancer incidence (morbidity and mortality) in Russia in 2011 / Eds. V.I. Chissov, V.V. Starinskij, G.V. Petrova. M., 2013. 288 p.
42. Kaprin A.D., Kostin A.A. Current approaches to diagnosis and treatment of patients with bladder cancer // *Lechashhij vrach: Zhurnal dlja praktikujushhego vracha.* 2003. № 7. P. 40–44.
43. TNM classification for malignant tumors. 6th edition / Eds. N.N. Blinova. SPb.: Jeskulap. 2003. 244 p.
44. Korobkin A.S., Ternovoj S.K., Pushkar' D.Ju. Comprehensive diagnosis of bladder cancer // *REJR.* 2012. Vol. 2 (4). P. 74–78.
45. Pushkar' D.Ju., Govorov A.V., Matveev V.B. Epidemiology of bladder cancer // *Plenum pravlenija Rossijskogo obshhestva urologov.* Nizhnij Novgorod, 2009. P. 280–286.
46. Strokova L.A. Diagnostic imaging of bladder cancer: Author's MD PhD thesis. M., 2009. 38 p.
47. Usova A.B., Frolova I.G., Afanas'ev S.G., Tarasova A.S. Potential role magnetic resonance imaging in diagnosis and assessment of treatment response in patients with rectal cancer // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2012. № 5. P. 74–80.
48. Harchenko V.P., Kotljarov P.M., Kaprin A.D. Bladder cancer: basic principles and potentials of diagnostic imaging // *Nevskij radiologicheskij forum «Novye gorizonty».* SPb., 2007. P. 332–335.
49. Chernyshev I.V., Lucenko P.E., Bulanov T.V. Role of low-field magnetic resonance imaging in diagnosis of bladder tumors // *Onkourologija.* 2010. № 1. P. 16–20.
50. Chojnzonov E.L., Pisareva L.F., Bojarkina A.P., Odincova I.N., Tahauov R.M. Cancer incidence among population of the Tomsk region. Tomsk: Izdatel'stvo TGU, 2004. 253 p.
51. Chojnzonov E.L., Pisareva L.F., Cherdynceva N.V., Bojarkina A.P., Odincova I.N., Martynova N.A. Cancer incidence in Siberia and the Russian Far East. Cancer care service and ways to improve it // *Bjulleten' Sibirskogo otdelenija RAMN.* 2004. № 2. P. 41–47.
52. Shavlade Z.N., Berezovskaja T.P., Neledov D.V., Shavlade N.Z. Prospective evaluation of magnetic-resonance imaging with contrast enhancement in the detection of local spread of bladder cancer // *RADIOLOGIJA-PRAKTIKA.* 2012. № 6. P. 40–48.
53. Bassi P-F, Pagano F. Invasive Bladder Cancer. Springer-Verlag, London Limited. 2007. 303 p.
54. Beyersdorff D., Zhang J., Sehofer H., Bochner B., Hricak H. Bladder cancer: can imaging change patient management? // *Curr. Opin. Urol.* 2008. Vol. 18 (1). P. 98–104.
55. Browne R.F., Meehan C.P., Colville J., Power R., Torreggiani W.C. Transitional cell carcinoma of the upper urinary tract: spectrum of imaging findings // *Radiographics.* 2005. Vol. 25 (6). P. 1609–1627.
56. El-Assmy A., Abou-El-Ghar M.E., Mosbah A., El-Nahas A.R., Refaie H.F., Hekal I.A., El-Diasty T., Ibrahim H. Bladder tumour staging: comparison of diffusion- and T2-weighted MR imaging // *Eur. Radiol.* 2009. Vol. 19. P. 1575–1581. doi: 10.1007/s00330-009-1340-7.
57. Fortuin A.S., Deserno W.M., Meijer H.J., Jager G.J., Takahashi S., Debats O.A., Reske S.N., Schick C., Krause B.J., van Oort I., Witjes A.J., Hoogeveen Y.L., van Lin E.N., Barentsz J.O. Value of PET/CT and MR lymphography in treatment of prostate cancer patients with lymph node metastases // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2012. Vol. 84. P. 712–718. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.12.093.
58. Hansel D.E. (ed.). The Urinary Tract: A Comprehensive Guide to Patient Diagnosis and Management // Springer Science + Business Media, New York, 2012. P. 98–99.
59. Kilicsezmez O., Cimilli T., Inci E., Kayhan A., Bayramoglu S., Tasdelen N., Gurmen N. Diffusion-weighted MRI of urinary bladder and prostate cancers // *Diagn. Interv. Radiol.* 2009. Vol. 15. P. 104–110.
60. Kim J.K., Park S.Y., Ahn H.J., Kim C.S., Cho K.S. Bladder cancer: analysis of multidetector row helical CT enhancement pattern and accuracy in tumor detection and perivesical staging // *Radiology.* 2004. Vol. 231 (3). P. 725–731.
61. Kim B., Semelka R.C., Ascher S.M., Chalpin D.B., Carroll P.R., Hricak H. Bladder tumor staging: comparison of contrast-enhanced CT, T1- and T2-weighted MR imaging, dynamic gadolinium-enhanced imaging, and late gadolinium-enhanced imaging // *Radiology.* 2004. Vol. 193 (1). P. 239–245.

Поступила 11.03.14

REFERENCES

1. Apolihin O.I., Sivkov A.V., Beshliev D.A., Solnceva T.V., Komarova V.A. Analysis of uro-nephrological incidence in Russian Federation in accordance with statistical data // *Jeksperimental'naja i klinicheskaja urologija.* 2010. № 1. P. 4–11.
2. Vorob'ev A.V. Classification and diagnosis of bladder cancer, problems of differential diagnosis // *Prakticheskaja onkologija.* 2003. Vol. 4 (4). P. 196–203.
3. Glybochko P.V., Zuev V.V., Popkov V.M., Chehonackaja M.L., Ponukalin A.N. Imaging techniques in diagnosis of bladder cancer // *Saratovskij nauchno-medicinskij zhurnal.* 2011. Vol. 7 (1). P. 148–151.
4. Grigor'ev E.G., Frolova I.G., Usynin E.A., Velichko S.A., Okunev V.V. Bladder cancer: Role of diagnostic imaging techniques (literature review) // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2013. № 3. P. 75–81.
5. Grigor'ev E.G., Frolova I.G., Usynin E.A. Magnetic resonance imaging in diagnosis of bladder cancer // *Materialy II S'ezda vrachej luchevoj diagnostiki SFO «Dostizhenija sovremennoj luchevoj diagnostiki v klinicheskoy praktike».* Bjulleten' sibirskoj mediciny, 2012. № 5 (Suppl.). P. 41–43.
6. Gromov A.I., Bujlov V.M. Imaging diagnosis and therapy in urology: national guidance. M.: GJeOTAR-Media, 2011. 544 p.
7. Davydov M.I., Aksel' E.M. Cancer statistics in Russia and CIS countries in 2004 // *Vestnik RONC im. N.N. Blohina RAMN.* 2006. Vol. 17 (3) Suppl. 1. P. 78–101.

29. Kobayashi S., Koga F., Yoshida S., Masuda H., Ishii C., Tanaka H., Komai Y., Yokoyama M., Saito K., Fujii Y., Kawakami S., Kihara K. Diagnostic performance of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in bladder cancer: potential utility of apparent diffusion coefficient values as a biomarker to predict clinical aggressiveness // *Eur. Radiol.* 2011. Vol. 21. P. 2178–2186. doi: 10.1007/s00330-011-2174-7.
30. Lee C.T., Wood D.P. *Current Clinical Urology: Bladder Cancer*. Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC, 2010.
31. Murphy W.M., Grignon D.J., Perlman E.J. *Tumors of the kidney, bladder, and related urinary structures*. Am. Registry of Pathology Washington, DC. 2004. 394 p.
32. Nishimura K., Fujiyama C., Nakashima K., Satoh Y., Tokuda Y., Uozumi J. The effects of neoadjuvant chemotherapy and chemo-radiation therapy on MRI staging in invasive bladder cancer: comparative study based on the pathological examination of whole layer bladder wall // *Int. Urol. Nephrol.* 2009. Vol. 41. P. 869–875. doi: 10.1007/s11255-009-9566-5.
33. Reimer P., Parizel P., Meaney J. et al. *Clinical MR Imaging*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2010.
34. Reiser R.F., Semmler W., Hricak H. et al. *Magnetic Resonance Tomography*. Springer, 2008.
35. Saksena M.A., Dahl D.M., Harisinghani M.G. New imaging modalities in bladder cancer // *World J. Urol.* 2006. P. 473–480.
36. Takeuchi M., Sasaki S., Ito M., Okada S., Takahashi S., Kawai T., Suzuki K., Oshima H., Hara M., Shibamoto Y. Urinary bladder cancer: diffusion-weighted MR imaging – accuracy for diagnosing T stage and estimating histologic grade // *Radiology*. 2009. 251. P. 112–121. doi: 10.1148/radiol.2511080873.
37. Tekes A., Kamel I., Imam K., Szarf G., Schoenberg M., Nasir K., Thompson R., Bluemke D. Dynamic MRI of bladder cancer: evaluation of staging accuracy // *AJR*. 2005. Vol. 184 (1). P. 121–127.
38. Tillou X., Grardel E., Fourmarier M., Bernasconi T., Demailly M., Hakami F., Saint F., Petit J. Can MRI be used to distinguish between superficial and invasive transitional cell bladder cancer? // *Prog. Urol.* 2008. Vol. 18 (7). P. 440–444. doi: 10.1016/j.purol.2008.04.019.
39. Wong-You-Cheong J.J., Woodward P.J., Manning M.A., Davis C.J. From the Archives of the AFIP: neoplasms of the urinary bladder: radiologic-pathologic correlation // *Radiographics*. 2006. Vol. 26 (2). P. 553–580.
40. Yekeler E., Suleyman E., Dursun M., Zorba U.O., Tunc M., Tunaci A., Acunas B. Bladder tumors: virtual MR cystoscopy // *Abdom. Imaging*. 2006. Vol. 31. P. 483–489.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК: 616-006:577.27

НОВОЕ МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННОГО БЕЛКА РМЕРА1

**В.В. Волкоморов^{1,2}, Е.С. Григорьева^{1,2}, М.С. Карбышев³, И.В. Митрофанова⁴,
Е.В. Кайгородова^{1,2}, Н.В. Чердынцева^{1,2}**

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск²

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск³

Международный биотехнологический центр «Генериум», Владимирская обл.,

Петушинский р-н, пос. Вольгинский⁴

634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5,

e-mail: grigorieva@oncology.tomsk.ru¹

Получено новое моноклональное антитело (мкАТ) к опухоль-ассоциированному белку РМЕРА1 (Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1), для которого показана дифференциальная экспрессия в ряде опухолей. Для тестирования специфичности нового мкАТ нами получен полноразмерный рекомбинантный белок РМЕРА1 в трансфицированной клеточной линии Нек293Т. После трансфекции плазмидным вектором pIRES-EGFP, содержащим вставку гена РМЕРА1, проводили оценку экспрессии белка РМЕРА1 в клетках линии НЕК293Т с помощью иммуноцитохимического исследования и вестерн-блот анализа. Способность нового мкАТ связывать РМЕРА1 в клиническом материале показана с помощью иммуногистохимического исследования на срезах ткани простаты, как положительного контроля. Новое антитело может послужить основой для создания коммерческого антитела для тестирования белка РМЕРА1 в биологических образцах человека.

Ключевые слова: РМЕРА1, моноклональные антитела, экспрессия, белковые маркеры

NEW MONOCLONAL ANTIBODY FOR TUMOR-ASSOCIATED PROTEIN PMEPA1 DETECTION

V.V. Volkomarov^{1,2}, E.S. Grigoryeva^{1,2}, M.S. Karbyshev³, I.V. Mitrofanova⁴,

E.V. Kaigorodova^{1,2}, N.V. Cherdyntseva^{1,2}

Cancer Research Institute of Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk¹

National Research Tomsk State University, Tomsk²

Siberian State Medical University, Tomsk³

International Biotechnology Center «Generium», Petushinski district, Volginsky village⁴

5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia,

e-mail: grigorieva@oncology.tomsk.ru¹

We obtained a new monoclonal antibody (mAb) against tumor-associated protein PMEPA1 (Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1) for which is shown differential expression in some tumors. To test the specificity of obtained mAb we have produced a full-length recombinant PMEPA1 in transfected HEK293T cell line. After transfection of the plasmid vector pIRES-EGFP, containing the insertion coding *PMEPA1* gene we evaluated PMEPA1 protein expression in HEK293T cells lines by immunocytochemical study and western-blot analysis. Ability of the new mAb binds PMEPA1 in clinical specimens is shown by immunohistochemistry on histological sections of prostate tissue used as positive control. New antibody may provide a basis for development of commercial antibody test for evaluation of protein expression in human biological samples.

Key words: PMEPA1, monoclonal antibodies, expression, protein markers.

РМЕРА1 (Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1) является трансмембранным

белком, обратившим на себя внимание исследователей в связи с его вовлеченностью в сигнальный

путь трансформирующего фактора роста β (TGF- β) [2, 8]. Сигнальный путь TGF- β играет ключевую роль в процессах клеточного роста, дифференцировки, апоптоза, вовлечен в регуляцию иммунного ответа, формирование злокачественных опухолей и их метастазирование. TGF- β функционирует как промотор опухолевой прогрессии путем индукции эпителиально-мезенхимального перехода, в результате которого опухолевые клетки приобретают способность к метастазированию [7]. Механизмы, лежащие в основе рецепторной активации и экспрессии генов, вовлеченных в сигнальные пути гена TGF- β , широко освещены в литературе [12]. Одним из белков, чья экспрессия непосредственно индуцируется в результате активации TGF- β сигнального пути, является РМЕРА1 [2]. Кроме того, известно, что РМЕРА1 может непосредственно связываться с молекулами R-Smad (Smad 2 и 3), которые являются посредниками в передаче сигнала от молекулы рецептора TGF- β в ядро, тем самым блокируя трансдукцию сигнала [14, 15].

Анализ имеющихся в литературе данных о функции белка РМЕРА1 определил его важное значение в процессах пролиферации и дифференцировки ряда тканей эпителиального происхождения, что позволило говорить о роли РМЕРА1 в развитии злокачественных новообразований различных локализаций. Существующие разрозненные данные свидетельствуют в пользу весьма неоднозначной роли данного белка в онкогенезе, требующей более детального уточнения. Повышенная экспрессия гена РМЕРА1 в опухолевой ткани отмечается у больных раком почки, легкого, толстой кишки, поджелудочной железы, яичников и молочной железы [2, 3, 7, 10]. При сравнении полнотранскриптомных профилей инвазивных опухолей простаты с нормальными тканями (или преинвазивными опухолями) было обнаружено, что *РМЕРА1* высоко экспрессируется в тканях опухолей, склонных к инвазивному росту. Соответственно, повышение его экспрессии ассоциировано с плохим прогнозом клинического течения заболевания [14]. В то же время другие авторы, исследующие роль *РМЕРА1* при раке простаты, приводят данные об увеличении вероятности прогрессии заболевания при снижении экспрессии *РМЕРА1* [6]. Вероятно, критическую роль при этом играют изменения рецепторного аппарата к андрогенам, которые наряду с TGF- β напрямую регулируют экспрессию *РМЕРА1* в ткани

простаты. Исходя из того, что существуют некоторые органоспецифичные особенности характера экспрессии *РМЕРА1*, необходимо уточнение его роли при каждой отдельной локализации злокачественного процесса.

Согласно нашим данным, РМЕРА1 является потенциальным маркером аденокарциномы желудка интестинального типа, что было установлено на основании проведенного биоинформатического поиска генов, обладающих более высокой экспрессией в опухоли по сравнению с неизменной тканью [4, 5, 13]. Повышенная экспрессия гена РМЕРА1 в опухолевой ткани желудка была подтверждена нами на собственной коллекции парных образцов нормальной и опухолевой ткани, полученных от больных с аденокарциномой желудка при операции. Наши данные подтверждают результаты других авторов о повышении генной экспрессии РМЕРА1 в аденокарциномах желудка [10].

В имеющейся литературе нам не удалось обнаружить информацию по исследованию белковой экспрессии РМЕРА1 в операционном клиническом материале, а соответственно, и о коммерчески доступных антителах, обладающих специфичностью для достоверной детекции РМЕРА1 в тканях. В то же время проведенные нами предварительные исследования показали неэффективность использования ряда коммерческих антител для детекции РМЕРА1 в экстрактах тканей и на гистологических срезах.

Это обусловило актуальность получения высокоспецифичных антител к РМЕРА1, которые бы могли детектировать этот белок в клинических образцах биологического материала.

Цель исследования: получение нового моноклонального антитела к опухоль-ассоциированному белку РМЕРА1 и подтверждение его специфичности.

Материал и методы

Получение гибридов мкАТ против РМЕРА1. В качестве антигена при иммунизации крыс использовался синтетический пептид ²⁷⁵WSKEKDKQKG²⁸⁷, конъюгированный с бычьим сывороточным альбумином и овальбумином (PSL, Германия). Подкожная и внутрибрюшинная иммунизация проводилась смесью 50 мкг пептида, 500 мкл фосфатно-солевого буфера и 500 мкл неполного адьюванта Фрейда (НАФ), содержащей 5 нМ CpG олигонуклеотида (Tib Mol-biol, Германия). Спустя шесть недель проводилась

повторная иммунизация раствором, не содержащим НАФ. Гибридизация лимфоцитов проводилась по стандартной методике [11]. мкАТ, показывающие специфическую активность против РМЕРА1, подвергались дальнейшему анализу с помощью иммуноблота.

Очистка полученных мкАТ. Перед нанесением образца сорбент уравнивали фосфатно-солевым буфером (5 объемов хроматографической колонки), рН 7,2–7,4 до выхода оптической плотности, проводимости и рН на постоянные значения. Культуральную жидкость наносили на сорбент MabSelect Sure со скоростью 0,25 мл/мин. По окончании нанесения сорбент промывали стартовым буфером (5 объемов хроматографической колонки) со скоростью 0,5 мл/мин. Белок элюировали буфером, содержащим 50 мМ CH_3COONa и 100 мМ L-Arg, рН 2,8, который подавали на колонку реверсивным током. Фракцию, содержащую целевое мкАТ, собирали в стерильный флакон и доводили рН до 6,5–7,0 раствором 2М Tris.

Получение рекомбинантного белка РМЕРА1 в культуре клеток линии НЕК293Т. Полноразмерный ген РМЕРА1 амплифицировали с использованием специфических праймеров, в состав которых вводили сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции NheI и EcoRI и клонировали в плазмиду pIRES-EGFP (Clontech, США). Транфекция проводилась кальций-фосфатным методом.

Иммуноблотинг. Клеточные лизаты подвергали электрофоретическому разделению по методу Лэммли в градиентном полиакриламидном геле (10–20 %). После разделения белки подвергали электропереносу на поливинил-дифторидную мембрану Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, США), используя Mini Trans-Blot transfer cell (Bio-Rad, США) в соответствии с рекомендациями производителя. При исследовании образцов специфическую реакцию определяли на пленке для выявления хемотрофической флуоресценции с помощью ECL Plus Western Blotting Detection System.

Иммуноцитохимическое исследование. Способность полученных мкАТ к связыванию белка РМЕРА1 была проанализирована с помощью иммуноцитохимии. Клетки, выращенные на покровных стеклах, промывали фосфатно-солевым буфером. Фиксация и пермеабиллизация проводилась абсолютным ацетоном при -20°C в течение 5 мин. В качестве вторичных антител использовали

овечьи антитела к IgG кролика, конъюгированные с родамином в разведении 1:300. Визуализация проводилась с помощью флуоресцентного микроскопа Axioimager Z1 с системой для улучшения контрастности ApoTome (Carl Zeiss, Германия). Изображения регистрировали с помощью камеры AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия).

Иммуногистохимическое исследование. В качестве материала для тестирования использовали депарафинизированные срезы тканей рака простаты 2 пациентов. Операционный материал фиксировали 10 % формалином, забуференным фосфатным буфером в течение 24 ч. Связавшиеся антитела выявляли, используя козьи антитела против первичных антител, конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1:100, раствор которых наносили на срезы на 30 мин. Для визуализации специфической реакции использовали Liquid DAB (Dako, Дания).

Результаты и обсуждение

Получение мкАТ, обладающих специфичностью к опухоль-ассоциированному белку РМЕРА1. Первоначально РМЕРА1 был идентифицирован как ген, экспрессия которого находится под контролем стероидных гормонов в ткани предстательной железы [16]. Основной белковый продукт гена РМЕРА1 содержит 287 аминокислотных остатков, являясь самой длинной формой, состоит из экстрацеллюлярного домена (40 аминокислот), трансмембранного домена (28 аминокислот) и длинного цитоплазматического «хвоста» (227 аминокислот) (рис. 1).

Для получения специфичных к РМЕРА1 мкАТ нами был выполнен поиск участков локализации антигенных детерминант, топологически наиболее доступных для взаимодействия антител с выявленным мембранным белком. В качестве антигена использовался синтетический пептид $^{275}\text{WSKEKDKQKGHNPL}^{287}$, представляющий собой С-концевую цитоплазматическую часть белка РМЕРА1 (рис. 1). Полученные мкАТ были очищены с помощью сорбента MabSelect (GE Healthcare, США) и протестированы на способность специфически связывать рекомбинантный белок РМЕРА1 в лизатах клеток линии Нек293Т, транзигентно экспрессирующих РМЕРА1 (рис. 2).

Тестирование специфичности полученных мкАТ против белка РМЕРА1. Клетки линии Нек293Т трансфицировали экспрессионным векто-

10	20	30	40	50	60
MHRLMGVNST	AAAAAGQPNV	SCTCNCKRSL	FQSMEITELE	FVQIIIVVV	MMVMVVVITC
70	80	90	100	110	120
LLSHYKLSAR	SFISRHSQGR	RREDALSSEG	CLWPSESTVS	GNGIPEPQVY	APPRPTDRLA
130	140	150	160	170	180
VPPFAQRERF	HRFQPTYPYL	QHEIDLPTI	SLSDGEEPPP	YQGPCTLQLR	DPEQQLELNR
190	200	210	220	230	240
ESVRAPPNRT	IFDSLMDSA	RLGGPCPPSS	NSGISATCYG	SGRMEGPPP	TYSEVIGHYP
250	260	270	280		
GSSFQHQSS	GPPSLLEGTR	LHHTHIAPLE	SAAIWSKEKD KQKGHPL		

Рис. 1. Аминокислотная последовательность канонической формы PMEPA1, синтезированный фрагмент выделен жирным шрифтом

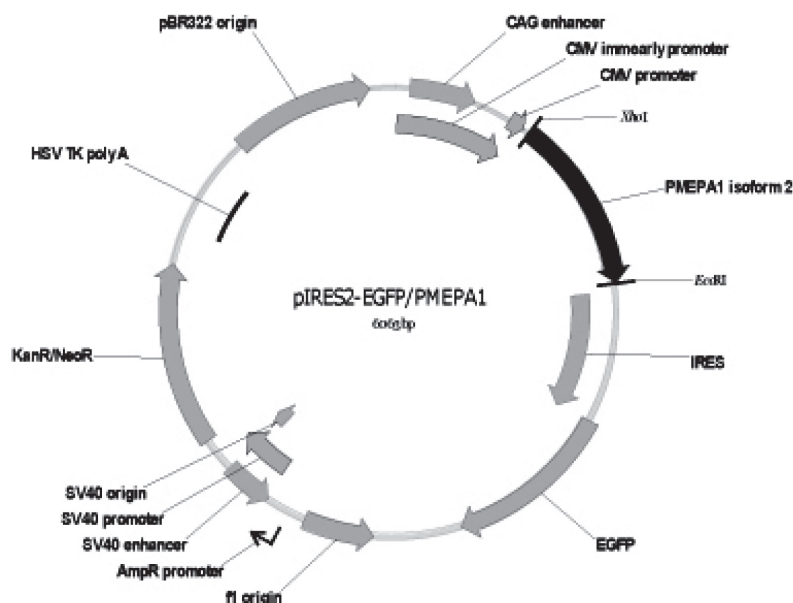


Рис. 2. Схема строения экспрессионной плазмиды pIRES-EGFP-PMEPA1

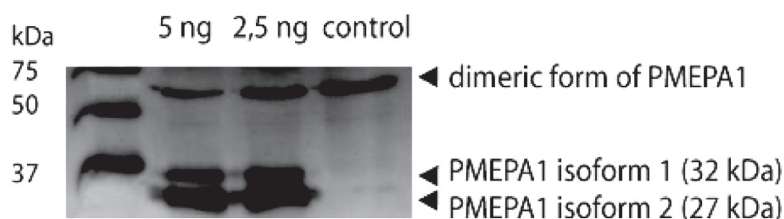


Рис. 3. Результат вестерн-блот анализа лизата трансфицированных клеток линии HeK293T различным количеством экспрессионного вектора

ром pIRES-EGFP, содержащим вставку, кодирующую полноразмерный белок PMEPA1, после чего лизировали RIPA буфером. Методом вестерн-блот

анализа проводили детекцию целевого белка с использованием полученных мкАТ. На рис. 3 видно, что мкАТ, помимо связывания с двумя изоформами

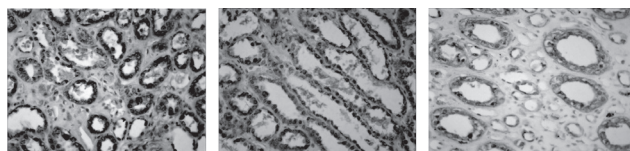


Рис. 4. Иммуногистохимическое исследование экспрессии белка PMEPA1 в ткани простаты с использованием полученных мкАТ, $\times 200$

РМЕРА1, специфически связывают белок, молекулярная масса которого приблизительно равна 65 kDa. Вероятно, этот бэнд соответствует димерной форме белка РМЕРА1. В литературе нет достоверных сведений о функциональной димеризации РМЕРА1, однако известно, что другие мембранные белки, имеющие сходную структуру, обладают такой способностью [1].

Способность полученных антител распознавать целевой белок в клетках линии НЕК293Т оценивали с помощью метода иммуноцитохимии. Визуализацию проводили с помощью антивидовых конъюгатов, меченных родамином. Трансфецированные клетки, содержащие генетическую конструкцию pIRES-EGFP-РМЕРА1, характеризовались более высоким уровнем флуоресценции, по сравнению с нетрансфецированными контрольными клетками. В иммуноцитохимическом исследовании мкАТ выявляют цитоплазматическую локализацию белка РМЕРА1.

Для оценки специфичности и пригодности применения полученных мкАТ для детекции РМЕРА1 в клинических образцах нами был использован иммуногистохимический анализ срезов ткани из парафиновых срезов (рис. 4). В качестве положительного контроля, то есть ткани, имеющей стабильно высокую экспрессию белка РМЕРА1, была выбрана нормальная ткань простаты [16]. Из рис. 4 видно, что наблюдается выраженная ядерно-цитоплазматическая экспрессия РМЕРА1. Локализация белка РМЕРА1 в непосредственной близости от аппарата Гольджи, которая визуализируется как ядерно-цитоплазматическое окрашивание, отмечалась и в исследованиях экспрессии РМЕРА1 в других типах тканей [9].

Заключение

Нами получено новое моноклональное анти-тело против опухоли-ассоциированного белка РМЕРА1, вовлеченного в TGF- β сигнальный путь, играющего важную роль в процессе эпителиально-

мезенхимального перехода. Полученные мкАТ обладают достаточной чувствительностью для детекции РМЕРА1 в клиническом материале и выявления особенностей его экспрессии в различных тканях. Новое анти-тело может послужить основой для создания коммерческого анти-тела для тестирования белка РМЕРА1 в биологических образцах человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brennan P.J., Kumagai T., Berezov A., Murali R., Greene M. HER2/Neu: mechanisms of dimerization/oligomerization // *Oncogene*. 2002. Vol. 21 (2). P. 328. doi: 10.1038/sj/onc/1205119.
2. Brunschwig E.B., Wilson K., Mack D., Dawson D., Lawrence E., Willson J.K., Lu S., Nosrati A., Rerko R.M., Swinler S., Beard L., Lutterbaugh J.D., Willis J., Platzer P., Markowitz S. PMEPA1, a transforming growth factor-beta-induced marker of terminal colonocyte differentiation whose expression is maintained in primary and metastatic colon cancer // *Cancer Res*. Vol. 63 (7). P. 1568–1575.
3. Giannini G., Ambrosini M.I., Di Marcotullio L., Cerignoli F., Zani M., MacKay A.R., Screpanti I., Frati L., Gulino A. EGF- and cell-cycle-regulated STAG1/PMEPA1/ERG1.2 belongs to a conserved gene family and is overexpressed and amplified in breast and ovarian cancer // *Mol. Carcinog*. 2003. Vol. 38 (4). P. 188–200. doi: 10.1002/mc.10162.
4. Grigor'eva E.S., Bukurova Iu.A., Krasnov G.S., Afanas'ev S.G., Cherdyn'tseva N.V., Tuzikov S.A., Choizonov E.L., Karpov V.L., Lisitsyn N.A., Beresten' S.F. Identification of proteins overexpressed in malignant gastric tumors: comparison of the results of 2-De and bioinformatics search // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2011. Vol. 45 (4). P. 738–743. DOI:10.1134/S0026893311030058.
5. Grigoryeva E.S., Cherdyn'tseva N.V., Karbyshev M.S., Volkomorov V.V., Stepanov I.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Buldakov M.A., Afanas'ev S.G., Tuzikov S.A., Bukurova Y.A., Lisitsyn N.A., Beresten S.F. Expression of Cyclophilin A in Gastric Adenocarcinoma Patients and Its Inverse Association with Local Relapses and Distant Metastasis // *Pathol. Oncol. Res*. 2013. [Epub ahead of print]. doi:10.1007/s12253-013-9718-x.
6. Hirokawa Y.S., Takagi A., Uchida K., Kozuka Y., Yoneda M., Watanabe M., Shiraishi T. High level expression of STAG1/PMEPA1 in an androgen-independent prostate cancer PC3 subclone // *Cell Mol. Biol. Lett*. 2007. Vol. 12 (3). P. 370–377. doi: 10.2478/s11658-007-0009-y.
7. Hu Y., He K., Wang D., Yuan X., Liu Y., Ji H., Song J. TMEPAI regulates EMT in lung cancer cells by modulating the ROS and IRS-1 signaling pathways // *Carcinogenesis*. 2013. Vol. 34 (8). P. 1764–1772. doi: 10.1093/carcin/bgt132.
8. Itoh S., Itoh F. Inhibitory machinery for the TGF- β family signaling pathway // *Growth Factors*. 2011. Vol. 29 (5). P. 163–173. doi: 10.3109/08977194.2011.614236.
9. Moul J., Srivastava S., Xu L. Patent US 20040092469 A1. Androgen-regulated PMEPA1 gene and polypeptides. 13.05.2004.
10. Rae F.K., Hooper J.D., Nicol D.L., Clements J.A. Characterization of a novel gene, STAG1/PMEPA1, upregulated in renal cell carcinoma and other solid tumors // *Mol. Carcinog*. 2001. Vol. 32 (1). P. 44–53. doi: 10.1002/mc.1063.
11. Rottach A., Kremmer E., Nowak D., Boisguerin P., Volkmer R., Cardoso M.C., Leonhardt H., Rothbauer U. Generation and characterization of a rat monoclonal antibody specific for PCNA // *Hybridoma (Larchmt)*. 2008. Vol. 27 (2). P. 91–98. doi: 10.1089/hyb.2008.0031.
12. Shi Y., Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus // *Cell*. 2003. Vol. 113 (6). P. 685–700. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X.
13. Volkomorov V., Grigoryeva E., Krasnov G., Litviakov N., Tsyganov M., Karbyshev M., Zavyalova M., Afanas'ev S., Cherdyn-

tseva N., Lisitsyn N., Beresten S. Search for potential gastric cancer markers using miRNA databases and gene expression analysis // *Exp Oncol.* 2013. Vol. 35 (1). P. 2–7.

14. *Vo Nguyen T.T., Watanabe Y., Shiba A., Noguchi M., Itoh S., Kato M.* TMEPA1/PMEPA1 enhances tumorigenic activities in lung cancer cells // *Cancer Sci.* 2014. Vol. 105 (3). P. 334–341. doi: 10.1111/cas.12355.

15. *Watanabe Y., Itoh S., Goto T., Ohnishi E., Inamitsu M., Itoh F., Satoh K., Wiercinska E., Yang W., Shi L., Tanaka A., Nakano N., Mommaas A.M., Shibuya H., Ten Dijke P., Kato M.* TMEPA1, a transmembrane TGF-beta-inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF-beta signaling // *Mol. Cell.* 2010. Vol. 37 (1). P. 123–134. doi: 10.1016/j.molcel.2009.10.028.

16. *Xu L.L., Shanmugam N., Segawa T., Sesterhenn I.A., McLeod D.G., Moul J.W., Srivastava S.* A novel androgen-regulated gene, PMEPA1, located on chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate // *Genomics.* 2000. Vol. 66 (3). P. 257–263. doi: 10.1006/geno.2000.6214

Поступила 17.04.14

СМЕШАННАЯ МЕЗОТЕЛИОМА ПЛЕВРЫ С МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ В МИОКАРД У МЫШИ BALB/C

В.Н. Манских, О.С. Ганчарова

ГОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», г. Москва
119992, г. Москва, Ленинские горы, стр. 73, e-mail: manskikh@mail.ru

Мезотелиома плевры смешанного типа представляет собой очень редкую спонтанную опухоль у лабораторных мышей. В статье описывается случай такой опухоли у мыши линии BALB/c, особенностью которого является наличие метастатического очага в миокарде, обсуждается дифференциальная диагностика плевральной мезотелиомы, бронхоальвеолярной аденокарциномы и злокачественной тимомы с диссеминацией по плевре у лабораторных животных.

Ключевые слова: спонтанные опухоли у лабораторных мышей, смешанная мезотелиома плевры.

MIXED PLEURAL MESOTHELIOMA WITH MYOCARDIAL METASTASIS IN BALB/C MOUSE

V.N. Manskikh, O.S. Gancharova

*M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow
Leninskie gory, bild. 73, 119992-Moscow, Russia, e-mail: manskikh@mail.ru*

Mixed pleural mesothelioma is uncommon spontaneous tumor in laboratory mice. The case of this tumor in BALB/c mouse has been described in the paper. It is essential that myocardial metastasis has been observed. Differential diagnostics between pleural mesothelioma, pleural dissemination of bronchoalveolar adenocarcinoma and malignant thymoma has been discussed in relation to described tumor.

Key words: spontaneous tumors in laboratory mice, mixed pleural mesothelioma.

Мезотелиома представляет собой первичную опухоль, которая развивается из выстилки брюшной полости, плевры или перикарда. У лабораторных мышей такие опухоли редко развиваются спонтанно, с частотой менее 0,1 % [2–5]. Различают три типа мезотелиом: эпителиоидный, мезенхимальный и смешанный [4]. По макроскопической морфологии выделяют также нодулярные и диффузные мезотелиомы. Линейные и половые различия для этих опухолей не установлены, метастазирование у мезотелиом неизвестно, а доброкачественный вариант существует только виртуально [3]. Экспериментальные мезотелиомы в довольно большом числе случаев развивались в опытах с введением мышам асбеста и цеолита, причем чаще других были отмечены опухоли мезенхимального типа, а эпителиоидные мезотелиомы были самыми редкими [3, 5]. Главную дифференциально-диагностическую проблему составляет отличие смешанных мезотелиом (независимо от того, являются ли они спонтанными или экспериментальными) от несравненно более частых у мышей бронхоальвеолярных карцином, когда последние распространяются на плевру и имеют анапластический саркомоподобный компо-

нент. Эта проблема указана, в частности, в международной классификации опухолей лабораторных мышей ВОЗ [4], однако никаких указаний на ее решение в этом руководстве не дается.

Ниже мы приводим собственное наблюдение мезотелиомы смешанного типа и примененный нами путь дифференциальной диагностики, основанный на гистохимических данных об аналогичных опухолях человека.

Мышь линии BALB/c, самец, возраст 704 дня, SPF-виварий Института биоорганической химии РАН им. Шемякина и Овчинникова (группа из 400 животных в возрасте от 12 до 30 мес, опыт производился с соблюдением этических правил Европейской директивы FELASA-2010). Спонтанная смерть. При вскрытии в грудной полости обнаружено большое количество ярко-красной кровянистой жидкости без сгустков. На поверхности париетальной плевры и около аорты заметны несколько плотно припаянных серых твердых узелков округлой формы до 3 мм в диаметре (рис. 1А). С одной из долей правого легкого спаян крупный плотный узел неправильной формы 7×5×5 мм, тоже серого цвета. Прочие участки

легких ярко-розовые, тестоватой консистенции. Медиастинальные лимфатические узлы значительно увеличены. Сердце имеет необычную форму, приближающуюся к шаровидной, и значительно увеличенную массу (0,19 г), однако без изменений цвета и поверхности. Прочие органы грудной и брюшной полости патологических изменений не имели. Для гистологического исследования были зафиксированы в 10 % формалине (pH=7,4) сердце, легкие, печень, обе почки, селезенка, полный комплекс внутренних половых органов, слепая кишка, желудок, толстый и тонкий кишечник, головной мозг, поджелудочная железа, бедренная кость, кожа и опухолевые узлы с участками грудной стенки. Срезы толщиной 4 мк с залитых в парафин образцов окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизон, Массону, альтиановым синим (pH=2,5) с обработкой контрольных срезов гиалуронидазой из семенников быка (БиоВитрум) и D-PAS (ШИК после инкубации с амилазой (БиоВитрум)).

При гистологическом исследовании выявлено, что опухоль имеет бифазное строение во всех исследованных образцах. Инвазивный рост неоплазмы в прилежащие ткани констатируется с несомненностью. Часть опухолевой ткани построена из мелких эпителиоподобных клеток полигональной или кубической формы, большинство из которых оформлено в солидные и тубулярные структуры (рис. 1Б). Митозы редки. Фокусов некроза не отмечается. Строма в таких участках видна достаточно отчетливо, и в ней заметна слабо выраженная мононуклеарная инфильтрация. Другая часть опухолевой паренхимы состоит из веретеновидных клеток с мелкими круглыми везикулярными ядрами, имеющими небольшие ядрышки (рис. 1В). Коллагеновая строма в таких участках выражена слабо, мононуклеарной инфильтрации не отмечается. Митотическая активность здесь также низкая. При исследовании сердца в миокарде неожиданно был обнаружен метастатический очаг, состоящий из низкодифференцированных мелких опухолевых клеток неправильной формы с везикулярными ядрами (рис. 1Г). Коллагеновая строма в этом очаге не выявлялась, воспалительной инфильтрации также заметно не было. Метастазы в лимфатические узлы имели бифазную морфологию и полностью замещали нормальные структуры. В других органах никаких изменений не найдено.

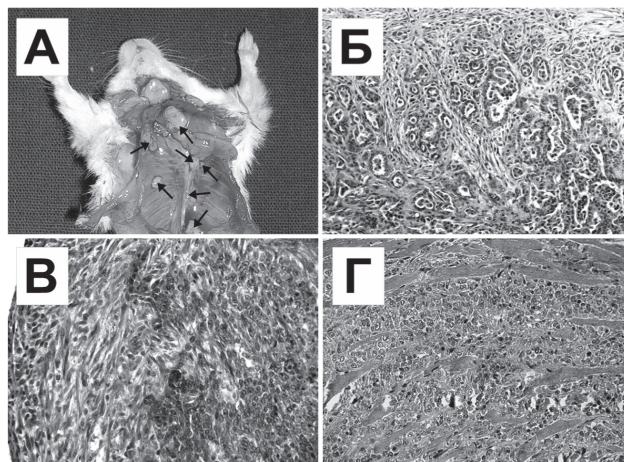


Рис. 1. Морфология спонтанной мезотелиомы смешанного типа у мыши BALB/c. А – макроскопическая картина (узлы опухоли указаны стрелками); Б – эпителиоидный компонент опухоли, $\times 200$; В – мезенхимальный компонент опухоли, $\times 400$; Г – метастаз в миокарде, $\times 400$. Примечание: микропрепараты на рис. 1 Б, В, Г – окраска гематоксилином и эозином

Описанная картина вполне соответствует морфологии нодулярной мезотелиомы смешанного типа. Особенностью данного случая является метастатическое поражение миокарда, которое при мезотелиомах у мышей пока не описано. Однако эти явления, включая метастазирование в миокард и бифазное строение, свойственны также редкому варианту бронхоальвеолярной аденокарциномы с анапластическим саркомоподобным компонентом. Поскольку алгоритма дифференциальной диагностики этих опухолей не существует, мы применили специальные методы окрашивания, которые обычно используются для дифференциации аденокарцином и мезотелиом у человека [1, 6]. Небольшая часть клеток эпителиоидного компонента опухоли содержала материал, позитивно окрашивающийся альтиановым синим, однако окраска полностью исчезала после обработки срезов гиалуронидазой. Реакция D-PAS была отрицательна. Как известно, это свойственно мезотелиоме, клетки которой содержат кислые мукополисахариды, но не аденокарциноме легкого. Для этой реакции пригоден только эпителиоидный компонент опухоли, тогда как клетки саркоматозного компонента (и метастаза в сердце) не содержали позитивно окрашивающегося материала, а окраска стромы при данном методе не учитывается. Окрашивание альтиановым синим без обработки гиалуронидазой, примененное в

работе [5], не может считаться валидным диагностическим методом, так как при этом отмечается позитивно окрашенный материал в клетках обеих опухолей. Что касается тимомы, с которой также требуется дифференцировать мезотелиому [5], то вовлечение тимуса, лимфоидный компонент и признаки плоскоклеточной дифференцировки в нашем случае полностью отсутствовали.

Таким образом, на основании макроскопических, гистологических и гистохимических данных нами был впервые установлен диагноз спонтанной нодулярной мезотелиомы плевры смешанного типа с метастазами в медиастинальные лимфатические узлы и миокард у мыши линии BALB/c.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Addis B., Roche H.* Problems in mesothelioma diagnosis // *Histopathology*. 2009. Vol.54. P. 55–68.
2. *Davis J.M.G.* Experimental and Spontaneous Mesotheliomas // *Lung Biology in Health and Disease: The Mesothelial Cells and Mesothelioma* / Eds. M.C. Jaurand, J. Bignon. Marcell Dekker, New York, 1994. P. 187–206.
3. *Maronpot R.R., Boorman G.A., Gaul B.W. et al.* Pathology of the Mouse: Reference and Atlas. Cache River Press, Saint Louis. 1999. 699 p.
4. *Mohr U., Capen C.C., Dungworth D.I. et al.* International Classification of Rodent Tumors. The Mouse. Springer-Verlag, Heidelberg-Berlin-NewYork, 2001. 496 p.
5. *Shirai M., Maejima T., Tanimoto T. et al.* Mixed Type of Malignant Mesothelioma in an Aged Male ICR Mouse // *J. Toxicol. Pathol.* 2011. Vol. 24. P. 169–172.
6. *Tischoff I., Neid M., Neumann V., Tannapfel A.* Pathohistological diagnosis and differential diagnosis // *Malignant mesothelioma* / A. Tannapfel (ed.). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2011. P. 57–78.

Поступила 25.02.14

СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

УДК: 618.146-006.6+618.3-06

РАК ШЕЙКИ МАТКИ НА ФОНЕ ЗАМЕРШЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ

А.Л. Чернышова¹, Л.А. Коломиец^{1,2}, Е.А. Фесик¹, М.К. Мерзлякова¹

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹
Сибирский медицинский университет, г. Томск²
634050, Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: alacher@list.ru¹

Рак шейки матки занимает первое место среди опухолей, ассоциированных с беременностью. Представленный клинический случай интересен по нескольким причинам. Во-первых, показано, что хорионический трофобласт явился мишенью для ВПЧ, в результате чего возникло прерывание беременности, что подтверждается анализом ВПЧ абортного материала (ДНК ВПЧ 16 типа высокая вирусная нагрузка). Кроме того, при минимальной опухолевой инвазии в шейке матки наблюдалось метастатическое поражение подвздошных лимфатических узлов, что существенно влияет на прогноз выживаемости.

Ключевые слова: рак шейки матки, вирус папилломы человека, замершая беременность.

COEXISTANCE OF CERVICAL CANCER AND MISSED ABORTION

A.L. Chernyshova¹, L.A. Kolomiets^{1,2}, E.A. Fesik¹, M.K. Merzlyakova¹
Cancer Research Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk¹
Siberian State Medical University, Tomsk²
5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia, e-mail: alacher@list.ru¹

Cervical cancer is the most common malignancy associated with pregnancy. The clinical case presented in this paper is of interest for several reasons. First, human chorionic trophoblast was shown to be a target for HPV, resulting in termination of pregnancy, as evidenced by the analysis of HPV of the abortion material (high HPV 16 viral load). In addition, iliac lymph node metastasis occurred in minimal tumor invasion, significantly affecting the rate of survival.

Key words: cervical cancer, human papillomavirus, missed abortion.

Рак шейки матки (РШМ) занимает первое место среди опухолей, ассоциированных с беременностью, она встречается с частотой 1–13 случаев на 10000 беременностей [3, 4]. Кроме РШМ, наиболее часто на фоне беременности наблюдаются рак молочной железы, лимфомы и меланомы. У больных РШМ сочетание с беременностью встречается в 1–3 % (каждый 50-й случай). Средний возраст больных раком шейки матки – 50 лет, причем отмечается два пика – 35–39 и 60–64 года. Поэтому сочетание РШМ и беременности в 30 % наблюдается среди женщин до 35 лет, в 23 % – до 45 лет. Средний возраст больных РШМ в сочетании с беременностью составляет 30 лет [7, 10].

Наиболее значимым фактором риска развития рака шейки матки как у беременных, так и небеременных является HPV-инфекция с относительным риском развития рака шейки матки от 4 до 10. Наибольший интерес вызывают HPV 16, 18, 31,

33 типов, регулярно обнаруживаемые при РШМ и составляющие группу «высокого риска». Отмечается пропорциональное увеличение частоты HPV во время беременности (28–31 %) по сравнению с небеременными (12,5–18,6 %). Этот факт можно объяснить с нескольких позиций. Во-первых, во время беременности активизируются процессы изменения цервикального эпителия, который наиболее чувствителен к HPV-инфекции в период метаплазии. Во-вторых, у беременных наблюдаются изменения гормонального фона, которые влияют на репликацию HPV и увеличивают скорость метапластических изменений.

Проблема неразвивающейся беременности остается социально значимой, в структуре репродуктивных потерь она составляет 10–20 % [1, 8]. Характерной чертой замершей беременности является сочетание этиологических факторов (генетических, вирусных, инфекционных), из них

важнейшими являются хромосомные aberrации. Основное число эмбрионов с aberrантным кариотипом гибнет в первые недели беременности. В первые 6–7 нед беременности аномальный кариотип имеют 60–75 % абортусов, в 12–17 нед – 20–25 %, в 17–28 нед – 2–7 %. Среди хромосомных aberrаций у абортусов аутосомные трисомии составляют 45–55 %, моносомия 45XO – 20–30 %, триплодия – 25–20 %, тетраплодия – 5 % [5]. Гибель эмбриона может быть обусловлена патологическим развитием зиготы, эмбриона, плода или структурными нарушениями в генетической программе развития плаценты [6, 7].

Одной из основных причин неразвивающейся беременности I триместра является вирусная инфекция. Данные о влиянии вируса папилломы человека (ВПЧ) на течение беременности и возможность инфицирования плода малочисленны и разноречивы. В работах одних авторов доказано, что переход вирусов в плаценту невозможен и при ВПЧ-инфицировании матери не происходит вертикальной передачи вируса во время I и II триместра беременности [8]. Другие исследования выдвинули и обосновали гипотезу, что хорионический трофобласт является мишенью для ВПЧ и в результате его поражения может возникнуть прерывание беременности. При анализе ВПЧ-инфицирования abortного материала ДНК ВПЧ 16 типа были обнаружены в 17,6 %, 18 типа – в 30,8 % случаев [5].

Все вышеизложенное показывает актуальность накопления клинического опыта лечения больных РШМ в сочетании с беременностью.

Больная 3., 34 лет госпитализирована в отделение гинекологии НИИ онкологии СО РАМН в феврале 2011 г. При поступлении предъявляла жалобы на задержку менструаций на 4 нед, тошноту, слабость, нагрубание молочных желез, периодические ноющие тянущие боли внизу живота, мажущие кровянистые выделения из половых путей. Указанные жалобы появились 3 нед назад, больная обратилась в отделение гинекологии женской консультации роддома № 4, где была обследована и с диагнозом: подозрение на рак шейки матки на фоне прогрессирующей беременности 6–7 нед направлена в НИИ онкологии.

При поступлении, при осмотре в зеркалах и бимануальном исследовании: наружные половые органы развиты правильно, оволосение по женскому типу, влагалище емкое. Шейка матки увеличена

до 5 см, эрозирована, контактно кровоточит, на 3–5 ч единичные папиллярные разрастания. Своды эластичные, свободные. Тракции за шейку матки безболезненные, из наружного зева – скудные кровянистые выделения. Матка увеличена до 11–12 нед, плотная, подвижная, безболезненная при пальпации. Придатки нормальных размеров, подвижные, безболезненные. Выделения – слизисто-сукровичные, скудные. Кольпоскопия: влагалищная часть шейки матки покрыта многослойным плоским эпителием. В области передней губы маточного зева в виде язычка и справа у наружного маточного зева видны несколько участков с грубой мозаикой на уксусно-беловатом эпителии, многочисленные атипические сосуды в виде грубых точек, а также отмечается повышенная ранимость эпителия. На 3–5 ч условного циферблата имеются возвышенные участки с интенсивной уксусно-белой окраской, небольшие кровоточащие эрозии и атипическая васкуляризация, которая проявляется в виде хаотически расположенных сосудов причудливой формы, не анастомозирующих между собой (разорванные спутанные сосуды, волосные игольчатые капилляры). Около наружного зева атипические сосуды в виде точек и отмечается повышенная ранимость сосудов. После применения пробы Шиллера в области частично передней и задней губы маточного зева визуализируются многочисленные участки эпителия с отрицательной реакцией на йод.

Выполнены мазки-отпечатки цитощеточкой «Цервикс-браш» для цитологического исследования и биопсия шейки матки под контролем кольпоскопа (участок от 3–6 ч). Цитологическое заключение: плоскоклеточный неороговевающий рак шейки матки. Гистологическое заключение: плоскоклеточный неороговевающий рак шейки матки с инвазией до 6–7 мм, умеренной степени дифференцировки.

Для выделения ДНК ВПЧ использовались соскобы из цервикального канала шейки матки. Применялась технология количественной мультиплексной real-time PCR, предназначенная для выявления 12 типов (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) ВПЧ, их генотипирования и определения количества ДНК в образце, использовали набор реагентов фирмы «Amplisens®» (Москва, Россия). Значение вирусной нагрузки рассчитывалось в геномных эквивалентах вируса/10⁵ клеток.

Порог релевантного количества вируса принимался равным 3 Ig ВПЧ /10⁵ клеток в соскобе. Исследование проводили на 6-канальном амплификаторе «RotorGene 6000» («Corbett Research», Австралия). У больной был выявлен 16 тип ВПЧ, Ig>5.

При общеклиническом обследовании выявлены следующие изменения: анемия легкой степени тяжести (Hb – 101 г/л), повышение уровня креатинина до 112 мкмоль/л. Уровень SCC в сыворотке крови – 2,3 МЕ.

По данным УЗИ, МРТ органов малого таза, брюшной полости (8.02.11): матка размером 114×116×120 мм, расположена обычно, с четкими ровными контурами. Миометрий зернистого характера, стенки матки истончены, полость неравномерно расширена от 36 мм и более, границы нечеткие. Содержимое матки в основном солидное с умеренным повышением эхогенности и наличием анэхогенных полостей. Шейка матки 48×36×37 мм, зернистого неоднородного характера, в толще единичные анэхогенные жидкостные включения до 5 мм, внутренний зев расширен до 14 мм, цервикальный канал до средней трети расширен до 5 мм. Контур передней и задней губы неровные, четкие, определяются гиперэхогенные линейные штрихи без акустических эффектов. Кровоток в толще матки смешанного типа. Яичники нормальных размеров, без патологии. Печень, почки, селезенка не изменены. В левой подвздошной области визуализируется цепочка увеличенных лимфатических узлов до 4 мм.

После предоперационной подготовки, 15.03.11 из нижнесрединного лапаротомного доступа выполнена операция в объеме экстрасфасциальной экстирпации матки с транспозицией яичников, с двухсторонней подвздошно-тазовой лимфаденэктомией. Макропрепарат: матка увеличена до 14–15 нед, плотная, подвижная; маточные трубы, яичники визуально не изменены.

При плановом гистологическом исследовании послеоперационного материала: в шейке матки покровный эпителий всюду присутствует – в основном обычной толщины и строения, но имеются участки истончения и гиперплазии, без признаков дисплазии. В шейке матки, как в слизистой, так и в мышечной стенке, имеются воспалительные преимущественно лимфоидные инфильтраты, во многих участках с наличием сегментоядерных лейкоцитов. В одном из препа-

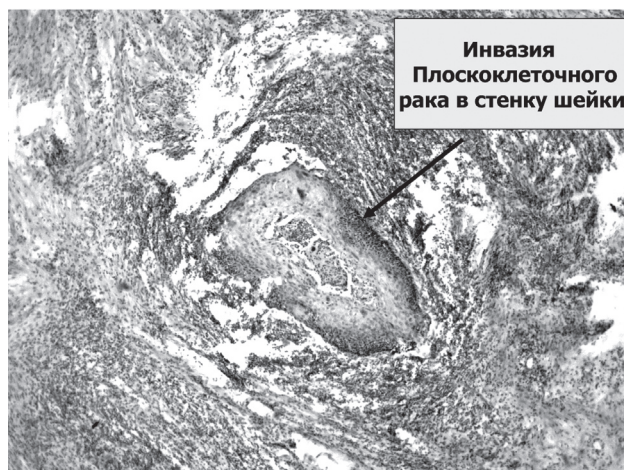


Рис. 1. Микрофото. Инвазия плоскоклеточного рака в стенку шейки. Окраска гематоксилином и эозином, ×10



Рис. 2. Микрофото. Мезенхимальная ворсина с выраженной гидропической дистрофией стромы. Окраска гематоксилином и эозином, ×5

ратов шейки матки обнаружены микроучастки плоскоклеточного рака без ороговения с перифокальной густой лимфоидной инфильтрацией (рис. 1). Оба участка находятся в 3 мм от покровного эпителия. В полости матки – в эндометрии – имеются обширные поля децидуальной ткани с дистрофическими и некротическими изменениями и кровоизлияниями. Имеется лейкоцитарная инфильтрация разной степени выраженности. В некоторых участках среди некроза встречаются отечные бессосудистые ворсины хориона (рис. 2). Выражено обратное развитие эндометрия после

нарушенной беременности с наличием реакции Ариас–Стелла. Описанная картина соответствует неразвивающейся (замершей) беременности со сроком не более 3–4 нед гестации на фоне хромосомной патологии и ДНК-вирусного поражения трофобласта. В миометрии умеренная очаговая, преимущественно лимфоидная, воспалительная инфильтрация, с наличием небольшого количества сегментоядерных лейкоцитов. Маточные трубы обычного строения. В правом яичнике имеется желтое тело беременности. В поверхностном слое левого яичника – метастаз плоскоклеточного рака. В трех лимфатических узлах из запирательной ямки справа и в 1 лимфоузле из запирательной ямки слева – метастазы плоскоклеточного рака. В остальных лимфоузлах – синусовый гистиоцитоз, очаговый липоматоз, гиалиноз. По линии резекции опухоли нет. Раковой эмболии не обнаружено.

Обнаруженные при морфологическом исследовании признаки ДНК-вирусного повреждения клеток цитотрофобласта были подтверждены дополнительными исследованиями мазков с шейки матки и биоматериала из хориального мешка. Был обнаружен вирус папилломы человека 16 типа, Ig>5. Концентрация ДНК ВПЧ (вирусная нагрузка) – повышенная СУММ Ig ВПЧ/10⁵ клеток = 6,41).

Вторым этапом комбинированного лечения был проведен курс сочетанной лучевой терапии по радикальной программе: дистанционная лучевая терапия СОД 44 Гр, внутриматочная лучевая терапия СОД 50 Гр. Кроме того, с учетом высокой нагрузки инфицированности ВПЧ 16 типа, больной была назначена терапия препаратом «ПАНАВИР» (МНН – нет, коммерческое название «ПАНАВИР», фирма-производитель ООО Медицинский центр «Эларт», страна-производитель Россия) [9, 10]. Проводилось внутривенное введение 0,04 % р-ра панавира в дозе 5,0 мл, на курс – 5 инъекций с перерывом 48 ч, параллельно применялся гель «ПАНАВИР» ежедневно в течение 10 дней. Через 1 мес курс внутривенного введения препарата «ПАНАВИР» повторялся. После окончания лечения проводилось контрольное исследование ВПЧ с помощью ВПЧ-типирования методом ПЦР. Выявлена негативная реакция на ВПЧ.

В настоящее время больная находится под динамическим наблюдением в отделении онкогинекологии ФГБУ «НИИ онкологии», при контрольном

обследовании 20.04.12 данных за прогрессирование не получено.

В представленном клиническом случае следует отметить несколько аспектов. Во-первых, показано, что хорионический трофобласт явился мишенью для ВПЧ, в результате его поражения возникло прерывание беременности, что подтверждается анализом ВПЧ абортного материала (ДНК ВПЧ 16 типа, высокая вирусная нагрузка). Во-вторых, особенностью клинического течения РШМ на фоне беременности явился тот факт, что при минимальной опухолевой инвазии в шейке матки (микроучастки плоскоклеточного рака без ороговения с инвазией до 3 мм) имеется метастатическое поражение подвздошных лимфатических узлов, что существенно влияет на прогноз выживаемости [2, 4, 11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамьян Л.В., Жордания К.И., Белобородов С.М. Репродуктивная функция у онкологических больных. Как сохранить возможность иметь детей // Вопросы онкологии. 2004. № 3. С. 279–292.
2. Бахидзе Е.В. Фертильность, беременность и гинекологический рак. СПб.: ДИЛЯ, 2004. 288 с.
3. Минкина Г.Н., Калинина В.С., Гаврикова М.В., Фириченко С.В., Храмова О.К. Постлечебный мониторинг цервикальных интраэпителиальных неоплазий // Журнал акушерства и женских болезней. 2011. Т. LX, № 1. С. 109–113.
4. Профилактика рака шейки матки: Руководство для врачей / Под ред. Г.Т. Сухих, В.Н. Прилепской. М.: МЕДпресс-информ, 2012. 190 с.
5. Серов О.Ф., Милованов А.П. Основные патоморфологические причины неразвивающейся беременности и обоснование прегравидарной терапии женщин // Акушерство и гинекология. 2001. № 3. С. 19–23.
6. Урманчеева А.Ф. Гинекологический рак в сочетании с беременностью // Практическая онкология. 2009. Т. 10, № 4. С. 184–197.
7. Урманчеева А.Ф. Рак шейки матки и беременность // Практическая онкология. 2002. Т. 3, № 3. С. 183–193.
8. Урманчеева А.Ф., Ульрих Е.А. Злокачественные опухоли женских половых органов и беременность: Учеб. пособие. СПб., 2012. 40 с.
9. Чернышова А.Л., Коломиец Л.А., Чуруксаева О.Н., Литвин А.А. Новые подходы к лечению предрака и рака шейки матки // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8, № 1. С. 51–53.
10. Чернышова А.Л., Коломиец Л.А. Возможности лечения НРV-ассоциированного предрака и рака шейки матки препаратом «Гроприноссин» // Русский медицинский журнал. 2012. Т. 20, № 1. С. 11–15.
11. Чернышова А.Л., Ляпунов А.Ю., Коломиец Л.А., Чернов В.И., Синилкин И.Г. Определение сторожевых лимфатических узлов при хирургическом лечении рака шейки матки // Сибирский онкологический журнал. 2012. № 3. С. 28–33.

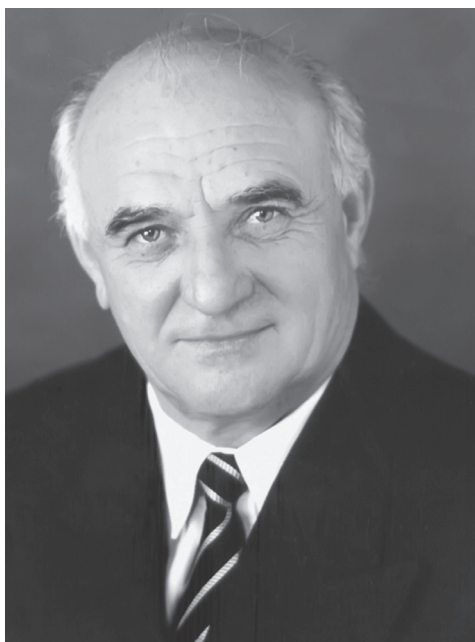
Поступила 11.03.14

REFERENCES

1. Adamjan L.V., Zhordaniya K.I., Beloborodov S.M. Reproductive function in cancer patients. How to preserve fertility // Voprosy onkologii. 2004. № 3. P. 279–292.
2. Bahidze E.V. Fertility, pregnancy and gynecological cancer. Spb.: DILJa, 2004. 288 p.

3. Minkina G.N., Kalinina V.S., Gavrikova M.V., Firichenko S.V., Hramova O.K. Post-treatment monitoring of cervical intraepithelial neoplasia // Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznej. 2011. T. LX (1). P. 109–113.
4. Prevention of cervical cancer: Guidelines for physicians / Eds. G.T. Suhii, V.N. Prilepskaja. M.: «MEDpress-inform», 2012. 190 p.
5. Serov O.F., Milovanov A.P. The main pathomorphological characteristics of missed miscarriage and justification of pregravidary therapy // Akusherstvo i ginekologija. 2001. № 3. P. 19–23.
6. Urmancheeva A.F. Gynecological cancer in combination with pregnancy // Prakticheskaja onkologija. 2009. Vol. 10 (4). P. 184–197.
7. Urmancheeva A.F. Cervical cancer and pregnancy // Prakticheskaja onkologija. 2002. Vol. 3 (3). P. 183–193.
8. Urmancheeva A.F., Ul'rih E.A. Female genital cancer and pregnancy: Guidelines. SPb., 2012. 40 s.
9. Chernyshova A.L., Kolomeic L.A., Churuksaeva O.N., Litvin A.A. New approaches to the treatment of precancer and cancer of the uterine cervix // Citokiny i vospalenie. 2009. Vol. 8 (1). P. 51–53.
10. Chernyshova A.L., Kolomeic L.A. Feasibility of treatment of HPV-associated precancerous cervical lesions and cervical cancer with Groprinosin // Russkij medicinskij zhurnal. 2012. Vol. 20 (1). P. 11–15.
11. Chernyshova A.L., Ljapunov A.Ju., Kolomeic L.A., Chernov V.I., Sinilkin I.G. Detection of sentinel lymph nodes in surgical treatment of cervical cancer // Sibirskij onkologicheskij zhurnal. 2012. № 3. P. 28–33.

ЮБИЛЕИ



К 70-ЛЕТНЕМУ ЮБИЛЕЮ АКАДЕМИКА МЕДИЦИНСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ АКАДЕМИИ НАУК МОЛДОВЫ ГЕОРГИЯ АНДРЕЕВИЧА ЦЫБЫРНЭ

Академик Георгий Андреевич Цыбырнэ – человек, посвятивший себя науке и охране здоровья людей, родился 16 февраля 1944 г. В 1962 г. окончил среднюю школу в родном селе и в том же году поступил в Кишиневский государственный медицинский институт, ныне Медицинский университет им. Н. Тестемицану.

В 1967 г., успешно окончив медицинский факультет, продолжил учебу в клинической ординатуре, а в 1969 г. поступил в аспирантуру в ОНЦ АМН СССР, где началось его формирование как ученого. Этот период, с 1969 по 1972 г., стал поворотным в судьбе молодого врача Георгия Цыбырнэ. Под руководством таких светил онкологии, как академик Н.Н. Блохин, академик Н.Н. Трапезников, профессор А.И. Пачес, профессор Ю.В. Фалилеев и профессор Е.С. Огальцова, он стал блестящим хирургом и учёным.

После окончания аспирантуры и защиты диссертации на тему «Применение механического шва при помощи УГ-2 для пластического закрытия дефектов глотки после ларингэктомии» молодой кандидат медицинских наук возвращается в Кишинев и начинает работать в Молдавском НИИ онкологии в качестве старшего научного сотрудника. При поддержке директора института

к.м.н. Г.Б. Хонелидзе в 1977 г. Г.А. Цыбырнэ открывает отделение хирургии опухолей головы и шеи, научным руководителем которого является до настоящего времени. Вокруг него формируется сплоченный коллектив, из которого в дальнейшем вырастает школа хирургов-онкологов, специализирующихся на лечении опухолей головы и шеи. Г.А. Цыбырнэ и его сотрудники занимаются разработкой и совершенствованием методов диагностики, хирургического лечения и реабилитации больных с новообразованиями в области головы и шеи. Особое внимание уделяется методикам пластической хирургии при расширенных операциях, в частности, разрабатываются методы пластического закрытия фарингоэзофагостом после комбинированной ларингэктомии с применением шейного стеблевого лоскута, дельто-пекторального и торако-дорзального лоскутов. Разрабатываются варианты тиреоидэктомий в зависимости от направления распространения опухоли щитовидной железы по отношению к перешейку.

Г.А. Цыбырнэ были осуществлены расширенные ларингэктомии, паротидэктомии, сотни других операций по поводу опухолей головы и шеи, обобщением этого труда стала диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

«Хирургическое лечение местно-распространенных опухолей головы и шеи», которая была успешно защищена в 1982 г. в ОНЦ АМН СССР.

В период с 1990 по 1995 г. Г.А. Цыбырнэ занимал должность директора Молдавского НИИ онкологии, ныне Онкологический институт Молдовы. За эти 5 лет институт под руководством профессора Г.А. Цыбырнэ утвердился как серьезный научный центр международного масштаба, был принят членом Общества онкологических институтов Европы и Международного общества противораковой борьбы. В 1993 г. Г.А. Цыбырнэ избран членом-корреспондентом АН Молдовы, а в 2007 г. – действительным членом медицинского отделения этой академии. С 1995 г. и по настоящее время академик Г.А. Цыбырнэ является вице-директором по науке в Институте онкологии Молдовы, внося огромный вклад в науку своим исследовательским и новаторским талантом.

Профессор Г.А. Цыбырнэ всегда уделял большое внимание воспитанию и подготовке молодых кадров. Он был ассистентом, затем доцентом, а с 1990 по 1995 г. – заведующим кафедрой онкологии Медицинского университета Молдовы. Под его руководством защищено 8 кандидатских и 7 докторских диссертаций. За годы своей научной деятельности академик Г.А. Цыбырнэ опубликовал более 500 научных работ, из них 15 монографий, 10 методических рекомендации, 11 патентов на изобретения. Об их научном значении можно судить по многочисленным наградам, полученным на различных научных симпозиумах и выставках.

Еще в начале своей деятельности в онкологии профессор Г.А. Цыбырнэ интересовала проблема профилактики злокачественных опухолей. С 1995 г. он является председателем общества «Профилактика рака», а в 1998 г. вместе с коллегами разработал «Национальную программу противораковой борьбы», которая в декабре 1998 г. утверждена правительством Республики Молдова и включает 3 основных стратегических направления:

- организация онкологической службы;
- первичная и вторичная профилактика;

– ранняя диагностика, лечение и реабилитация онкологических больных с целью снижения заболеваемости, смертности и улучшения качества жизни больных.

В Академии наук Молдовы академик Г.А. Цыбырнэ организовал журнал «Вестник Академии наук. Медицина» и является его главным редактором с 2009 г. Посредством этого научного издания стало возможным научное сотрудничество с онкологами других стран, что способствовало международному признанию молдавской онкологической науки. Журнал включен в список «В».

Академик Г.А. Цыбырнэ является членом «L' Union Medicale Balcanique», «The European Association on Cancer Research», «American Hand and Neck Society», членом Коллегии врачей Молдовы. За особые заслуги и вклад в развитие медицинской науки академику Г.А. Цыбырнэ было присвоено звание «Заслуженный врач» (2000); он был награжден орденом Трудовой Славы (2004); медалью «Н. Тестемицану» (2006); Государственной премией в области науки (2008); «Орденом Республики» (2011) и медалью АН Молдовы «Дмитрии Кантемир» (2014).

В настоящее время академик Г.А. Цыбырнэ продолжает трудиться с тем же энтузиазмом и присутствием ему энергией, олицетворяя собой удачное сочетание практического врача и ученого. 70 лет – это, конечно, серьезный возраст, но для академика Г.А. Цыбырнэ это возраст зрелости, опыты и серьезных планов на будущее. В последнее время Г.А. Цыбырнэ уделяет внимание таким научным и клиническим направлениям, как мини-инвазивная хирургия, закрытие фарингоэзофагостомы более совершенным механическим ушивателем, разработанным им, метод одномоментного пластического закрытия тканевых и костных дефектов, используя эктопротезирование, метод лечения рака языка интраартериальной химиотерапией, в хирургической тактике он отдает предпочтение органосохраняющим операциям.

Мы поздравляем нашего друга и коллегу со знаменательным юбилеем, желаем ему здоровья и творческого долголетия на благо здоровья людей, а также долгой и счастливой семейной жизни.

Редакция «Сибирского онкологического журнала»