

Учредитель:
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»

сайт: www.siboncoj.ru

Журнал издается при поддержке
Национального союза «Ассоциация онкологов России»

Издается с мая 2002 г.
Индекс по каталогу
«Роспечать» - 46827

Адрес редакции:

634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5
Томский национальный исследовательский медицинский
центр Российской академии наук, редакция «Сибирского
онкологического журнала»
тел.: (3822) 51-32-69, (3822) 28-26-78
факс: (3822) 28-26-86
E-mail: sjo@oncology.tomsk.ru,
AfanasievSG@oncology.tomsk.ru

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.

Журнал включен в РЖ и БД ВИНТИ, международную
справочную систему «Ulrich's International Periodicals
Directory», Научную электронную библиотеку (elibrary.
ru), электронную библиотеку «Cyberleninka», онлайн-
платформу «Directory of Open Access Journals» (DOAJ).
Журнал индексируется в БД «Российский индекс научного
цитирования» (РИНЦ), БД «Scopus».

Редакторы:

В.С. Сумарокова, Е.В. Лукина

Верстка:



Подписано в печать 26.02.2019 г.

Формат 60x84^{1/8}.

Бумага офсетная №1. Печать офсетная.

Гарнитура Times New Roman Cyr

Печ. л. 15,5; усл. печ. л. 14,4; уч.-изд. л. 15,3.

Тираж 1000 экз. Заказ .

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

При перепечатке ссылка на
«Сибирский онкологический журнал» обязательна

© Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук

СИБИРСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

SIBERIAN JOURNAL OF ONCOLOGY

SIBIRSKIY ONCOLOGICHESKIY ZHURNAL

Двухмесячный научно-практический журнал

Том 18, № 1 2019

Главный редактор -

Е.Л. Чойнзонов, *д.м.н., академик РАН, профессор (г. Томск, Россия)*

Заместители главного редактора:

В.Е. Гольдберг, *д.м.н., профессор (г. Томск, Россия)*

Н.В. Чердынцева, *д.б.н., член-корр. РАН, профессор (г. Томск, Россия)*

В.И. Чернов, *д.м.н., профессор (г. Томск, Россия)*

Отв. секретари:

С.Г. Афанасьев, *д.м.н., профессор (г. Томск, Россия)*

И.В. Кондакова, *д.м.н., профессор (г. Томск, Россия)*

Члены редколлегии:

Л.А. Ашрафян, *академик РАН, д.м.н., профессор (г. Москва, Россия)*

Л.М. Берштейн, *д.м.н., профессор (г. Санкт-Петербург, Россия)*

М.И. Давыдов, *академик РАН, д.м.н., профессор (г. Москва, Россия)*

Д.Г. Заридзе, *д.м.н., член-корр. РАН, профессор (г. Москва, Россия)*

Е.Н. Имянитов, *д.м.н., член-корр. РАН,*

профессор (г. Санкт-Петербург, Россия)

А.Д. Каприн, *академик РАН, д.м.н., профессор (г. Москва, Россия)*

Л.А. Коломиец, *д.м.н., профессор (г. Томск, Россия)*

М.А. Красильников, *д.б.н., профессор (г. Москва, Россия)*

А.В. Лисица, *д.б.н., академик РАН, профессор (г. Москва, Россия)*

Н.В. Литвяков, *д.б.н. (г. Томск, Россия)*

Л.Н. Любченко, *д.м.н., профессор (г. Москва, Россия)*

В.М. Моисеенко, *д.м.н., профессор (г. Санкт-Петербург, Россия)*

С.А. Некрылов, *д.и.н., профессор (г. Томск, Россия)*

В.А. Новиков, *д.м.н. (г. Томск, Россия)*

И.Н. Одинцова, *д.м.н. (г. Томск, Россия)*

В.М. Перельмутер, *д.м.н., профессор (г. Томск, Россия)*

И.В. Решетов, *д.м.н., академик РАН, профессор (г. Москва, Россия)*

Е.М. Слонимская, *д.м.н., профессор (г. Томск, Россия)*

В.В. Старинский, *д.м.н., профессор (г. Москва, Россия)*

Ж.А. Старцева, *д.м.н., профессор (г. Томск, Россия)*

В.А. Ткачук, *академик РАН, д.б.н., профессор (г. Москва, Россия)*

С.А. Тузиков, *д.м.н., профессор (г. Томск, Россия)*

С.А. Тюлядин, *д.м.н., профессор (г. Москва, Россия)*

В.В. Удуг, *д.м.н., член-корр. РАН, профессор (г. Томск, Россия)*

И.Г. Фролова, *д.м.н., профессор (г. Томск, Россия)*

О.В. Черемисина, *д.м.н. (г. Томск, Россия)*

Е.Р. Черных, *д.м.н., член-корр. РАН, профессор (г. Новосибирск, Россия)*

С. Айер, *профессор (г. Кочи, Индия)*

М. Джугашвили, *MD, PhD (Испания)*

В. Кесик, *д.м.н., профессор (Хорватия)*

Ю. Кжышковска, *д.б.н., профессор (Германия)*

Т. Кондо, *профессор (Япония)*

Г. Марголин, *профессор (Швеция)*

Л. Унгар, *профессор (Венгрия)*

М. Фрейдин, *PhD (Великобритания)*

Т.-Х. Чунг, *профессор (г. Гонконг, Китай)*

Дж. Ша, *MS MD, F.A.C.S. (США)*

А. Шаха, *профессор (Нью Йорк, США)*

А.Ю., *профессор (Тайвань)*

Founder of the Journal

Federal State Budgetary Scientific Institution «Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences»

Web-site: www.siboncoj.ru

The Journal is published with the support of the Russian Oncology Association

The Journal was founded in 2002

Subscription index in the Rospechat Agency Catalogue is 46827

Address of the Editorial Office:

Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences,

Editorial Board of Siberian Journal of Oncology

5, Kooperativny Street., 634009, Tomsk, Russia

tel.: +7 (3822) 51-32-69, (3822) 28-26-78

fax: +7 (3822) 28-26-86

E-mail: sjo@oncology.tomsk.ru,

AfanasyevSG@oncology.tomsk.ru

The journal was registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Registration certificate: PI № 77-14937.

The journal has been included in the list of Russian peer-reviewed scientific journals, which publish major scientific results of dissertations for PhD degree.

The journal has been included in the Abstract Journal and VINITI databases, Ulrich's International Periodicals Directory, Scientific Electronic Library (elibrary.ru), Cyberleninka electronic library, and Directory of Open Access Journals (DOAJ). The journal is indexed in Russian Science Citation Index (RSCI) and SCOPUS

Editors: Sumarokova V.S., Lukina E.V.
Maker-up:



Signed for publication: 26.02.2019
Format: 60x84 1/8. Litho

Printing: 1000 copies
Printed by TSU press
66 Lenina Str., 634050, Tomsk, Russia

© Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences

SIBERIAN JOURNAL OF ONCOLOGY

SIBIRSKIY ONCOLOGICHESKIY ZHURNAL

SCIENTIFIC PRACTICAL JOURNAL
ISSUED ONCE IN TWO MONTHS

Vol. 18, № 1 2019

Editor-in-Chief :

E.L. Chohnzonov, MD, PhD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

Associate Editors:

V.E. Goldberg, MD, PhD, Professor (Tomsk, Russia)

N.V. Cherdyntseva, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

Executive Editors:

S.G. Afanasyev, MD, PhD, Professor (Tomsk, Russia)

I.V. Kondakova, MD, PhD, Professor (Tomsk, Russia)

Editorial Board:

L.A. Ashrafyan, MD, PhD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

L.M. Bershtein, MD, PhD, Professor (St. Petersburg, Russia)

M.I. Davydov, MD, PhD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

D.G. Zaridze, MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

E.N. Imyaninov, MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences (St. Petersburg, Russia)

A.D. Kaprin, MD, PhD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

L.A. Kolomiets, MD, PhD, Professor (Tomsk, Russia)

M.A. Krasilnikov, PhD, Professor (Moscow, Russia)

A.V. Lisitsa, PhD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

N.V. Litvyakov, PhD, DSc (Tomsk, Russia)

L.N. Lyubchenko, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

V.M. Moiseenko, MD, PhD, Professor (St. Petersburg, Russia)

S.A. Nekrylov, PhD, Professor (Tomsk, Russia)

V.A. Novikov, MD, PhD, DSc (Tomsk, Russia)

I.N. Odintsova, PhD, DSc (Tomsk, Russia)

V.M. Perelmuter, MD, PhD, Professor (Tomsk, Russia)

I.V. Reshetov, MD, PhD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

E.M. Slonimskaya, MD, PhD, Professor (Tomsk, Russia)

V.V. Starinsky, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

Zh.A. Startseva, MD, PhD, Professor (Tomsk, Russia)

V.A. Tkachuk, PhD, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

S.A. Tuzikov, MD, PhD, Professor (Tomsk, Russia)

S.A. Tyulyandin, MD, PhD, Professor (Moscow, Russia)

V.V. Udut, MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia)

I.G. Frolova, MD, PhD, Professor (Tomsk, Russia)

O.V. Cheremisina, MD, PhD, Professor (Tomsk, Russia)

E.R. Chnykh, MD, PhD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia)

S. Iyer, Professor (India)

M. Dzhugashvili, MD, PhD (Spain)

V. Kesik, MD, PhD, Professor (Croatia)

Yu. Kzhyshkovska, Professor (Germany)

T. Kondo, Professor (Japan)

G. Margolin, Professor (Sweden)

L. Ungar, Professor (Hungary)

M. Freidin, PhD (United Kingdom)

Tak-Hong Cheung, MBBS, MD, Professor (Hong-Kong, China)

J. Shah, MS MD, F.A.C.S. (USA)

Ashok Shaha, MD, PhD, F.A.C.S. (New York, USA)

A. Yu, Professor (Taiwan)

СОДЕРЖАНИЕ

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рыков М.Ю. Медицинская помощь детям с онкологическими заболеваниями в Сибирском федеральном округе	5
---	---

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цыганов М.М., Дерюшева И.В., Родионов Е.О., Ефтеев Л.А., Миллер С.В., Ибрагимова М.К., Перминова Е.Е., Черемисина О.В., Фролова И.Г., Тузиков С.А., Литвяков Н.В. Экспрессия мРНК генов химиочувствительности как предиктор ответа на неоадъювантную химиотерапию при немелкоклеточном раке легкого	13
Бывальцев В.А., Степанов И.А. Особенности и факторы риска рецидивирования интрадуральных опухолей спинного мозга	21
Расулов Р.И., Юдин А.А., Сонголов Г.И. Метастатическое поражение печени при колоректальном раке у ранее радикально леченных больных	30
Дмитриева Н.В., Агинова В.В., Петухова И.Н., Григорьевская З.В., Дмитриева А.И., Багирова Н.С., Терещенко И.В., Хмаладзе Е.Н. Нозокомиальные инфекции, вызванные бактериями семейства <i>Enterobacteriaceae</i> , в онкологической клинике	36

ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Борова Е.А., Антонец Д.В., Старостина Е.В., Карпенко Л.И., Жеравин А.А., Ильичев А.А., Бажан С.И. Способность искусственных антигенных конструкций, содержащих эпитопы белков, ассоциированных с меланомой, стимулировать цитотоксическую активность мононуклеарных клеток периферической крови в отношении клеток меланомы	43
Власова О.А., Борунова А.А., Сафина А., Сметанина И.В., Лесовая Е.А., Белицкий Г.А., Заботина Т.Н., Гурова К., Кирсанов К.И., Якубовская М.Г. Активация сигнального пути интерферона-альфа ресвератролом, генистеином и кверцетином	50
Лыков А.П., Кабаков А.В., Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Райтер Т.В., Казаков О.В., Стрункин Д.Н., Суровцева М.А., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Опухоль-ассоциированные мезенхимные стволовые клетки при химически-индуцированном раке молочной железы у крыс Wistar	56
Бакина О.В., Первилов А.В., Глазкова Е.А., Сваровская Н.В., Ложкомоев А.С., Лернер М.И., Августиневич А.В. Новые магнитоуправляемые биметаллические «янус»-наночастицы Ag-Fe для современной противоопухолевой терапии	65
Киреева Г.С., Беляева О.А., Сенчик К.Ю., Беспалов В.Г., Стуков А.Н., Губарева Е.А., Майдин М.А. Асцитная опухоль яичников у крыс – адекватная доклиническая модель канцероматоза для изучения интраперитонеального химиоперфузионного лечения	71
Боровская Т.Г., Полуэктова М.Е., Вычужанина А.В., Щемерова Ю.А., Гольдберг В.Е. Фармакологическая коррекция патологических изменений у жизнеспособного потомства крыс, вызванных цитостатическим воздействием на стадии прогенеза	79

ОПЫТ РАБОТЫ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ

Михайлова И.Н., Анурова О.А., Лушникова А.А., Цыганова И.В., Сендерович А.И., Кондратьева Т.Т., Демидов Л.В., Мазуренко Н.Н. Фенотипическая пластичность метастатической меланомы	86
Максимова Н.А., Пржедецкий Ю.В., Хохлова О.В., Позднякова В.В., Ильченко М.Г., Максимова М.И. Ультразвуковое исследование при планировании операций по поводу меланомы кожи конечностей	95

ОБЗОРЫ

Францев Д.Ю., Сергеева О.Н., Долгушин Б.И. Лечение гиллюсной холангиокарциномы. Современное состояние вопроса	103
Виллерт А.Б., Коломиец Л.А., Юнусова Н.В., Иванова А.А. Асцит как предмет исследований при раке яичников	116

CONTENTS

EPIDEMIOLOGICAL STUDIES

Rykov M.Yu. Medical care for children with cancer in the Siberian Federal District	5
---	---

CLINICAL STUDIES

Tsyganov M.M., Deryusheva I.V., Rodionov E.O., Efteev L.A., Miller S.V., Ibragimova M.K., Perminova E.E., Cheremisina O.V., Frolova I.G., Tuzikov S.A., Litviakov N.V. mRNA expression of chemosensitivity genes as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer	13
Byvaltsev V.A., Stepanov I.A. Features and risk factors for recurrence of intradural spinal tumors	21
Rasulov R.I., Yudin A.A., Songolov G.I. Liver metastases in patients with curatively treated colorectal cancer	30
Dmitrieva N.V., Aginova V.V., Petukhova I.N., Grigorievskaya Z.V., Dmitrieva A.I., Bagirova N.S., Tereshchenko I.V., Khmaladze E.N. Nosocomial infections caused by bacteria of <i>Enterobacteriaceae</i> family in cancer clinic	36

LABORATORY AND EXPERIMENTAL STUDIES

Borobova E.A., Antonets D.V., Starostina E.V., Karpenko L.I., Zheravin A.A., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Ability of protein epitope-containing constructs associated with melanoma to stimulate the cytotoxic activity of peripheral blood mononuclear cells against melanoma cells	43
Vlasova O.A., Borunova A.A., Safina A., Smetanina I.V., Lesovaya E.A., Belitsky G.A., Zabolina T.N., Gurova K., Kirsanov K.I., Yakubovskaya M.G. Activation of interferon- α signaling by resveratrol, genistein and quercetin	50
Lykov A.P., Kabakov A.V., Bondarenko N.A., Poveshchenko O.V., Rayter T.V., Kazakov O.V., Strunkin D.N., Surovtseva M.A., Poveshchenko A.F., Kononov V.I. Tumor-associated mesenchymal stem cells in chemically-induced breast cancer in Wistar rats	56
Bakina O.V., Pervikov A.V., Glazkova E.A., Svarovskaya N.V., Lozhkomoiev A.S., Lerner M.I., Avgustinovich A.V. New magnetic bimetallic yam-like Ag-Fe nanoparticles for antitumor therapy	65
Kireeva G.S., Belyaeva O.A., Senchik K.Y., Bepalov V.G., Stukov A.N., Gubareva E.A., Maydin M.A. Ascitic ovarian cancer is an adequate preclinical model of carcinomatosis to study intraperitoneal chemoperfusion treatment	71
Borovskaya T.G., Poluektova M.E., Vychuzhanina A.V., Shchemerova Yu.A., Goldberg V.E. Pharmacological correction of pathological changes in the viable offspring of rats, caused by cytostatic impact at the stage of progenesis.....	79

PRACTICE OF ONCOLOGY

Mikhaylova I.N., Anurova O.A., Lushnikova A.A., Tsyganova I.V., Senderovich A.S., Kondratieva T.T., Demidov L.V., Mazurenko N.N. Phenotypic plasticity of metastatic melanoma	86
Maksimova N.A., Przhedetsky Yu.V., Khokhlova O.V., Pozdnyakova V.V., Ilchenko M.G., Maksimova M.I. Ultrasound scan in planning surgery for cutaneous melanoma of the extremities	95

REVIEWS

Frantsev D.Yu., Sergeeva O.N., Dolgushin B.I. Therapy for hilar cholangiocarcinoma	103
Villert A.B., Kolomiets L.A., Yunusova N.V., Ivanova A.A. Ascites as a subject of studies in ovarian cancer	116

DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-5-12

УДК: 616-006-053.2:614.2 (571.1/5)

Для цитирования: Рыков М.Ю. Медицинская помощь детям с онкологическими заболеваниями в Сибирском федеральном округе. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 5–12. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-5-12.

For citation: Rykov M. Yu. Medical care for children with cancer in the Siberian Federal District. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 5–12. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-5-12.

МЕДИЦИНСКАЯ ПОМОЩЬ ДЕТЯМ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ В СИБИРСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ

М.Ю. Рыков^{1,2}

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина
Минздрава России, г. Москва, Россия¹

Россия, г. Москва, 115478, Каширское шоссе, 24. E-mail: wordex2006@rambler.ru¹

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Минздрава России, г. Москва, Россия²

Россия, г. Москва, 119991, ул. Трубецкая, 8/2. E-mail: wordex2006@rambler.ru²

Аннотация

Введение. Анализ качества медицинской помощи детям с онкологическими заболеваниями основывается на статистических данных. Оценка полученных результатов служит основой стратегии развития медицинской помощи данной категории пациентов. **Цель исследования** – анализ основных показателей, характеризующих медицинскую помощь детям с онкологическими заболеваниями в Сибирском федеральном округе. **Материал и методы.** Проанализированы оперативные отчеты органов исполнительной власти в сфере охраны здоровья за 2017 г. 11/12 (91,6 %) субъектов Российской Федерации, входящих в состав Сибирского федерального округа (Министерство здравоохранения Иркутской области данные не предоставило). **Результаты.** Численность детского населения составила 3 722 470 чел. (0–17 лет), число детских онкологических коек – 260 (0,7 на 10 тыс. детей 0–17 лет), среднее число дней занятости койки в году – 342,2 койко-дня. В 3 (25 %) субъектах отделения детской онкологии отсутствуют, в 1 (8,3 %) – отсутствуют детские онкологические койки. Число врачей, оказывающих медицинскую помощь детям с онкологическими заболеваниями, – 49, из них 32 (65,3 %, 0,08 на 10 тыс. детей 0–17 лет) имеют сертификат врача-детского онколога. В 1 (8,3 %) субъекте врачи-детские онкологи отсутствуют. Заболеваемость злокачественными новообразованиями составила 11,7 (на 100 тыс. детей 0–17 лет), распространенность 69,6 (на 100 тыс. детей 0–17 лет), смертность – 2,2 (на 100 тыс. детей 0–17 лет), одногодичная летальность – 7,4 %. Активно выявлено 7,1 % пациентов. На лечение в медицинские организации федерального подчинения направлено 188 (43,2 %) первичных пациентов, за пределы территории Российской Федерации уехало 17 (3,9 %) первичных пациентов. **Заключение.** Низкий уровень заболеваемости и смертности объясняется дефектами учета и отсутствием достоверных катamnестических данных. Целесообразно внедрение электронных систем учета. Для достоверной оценки уровня обеспеченности населения детскими онкологическими койками и процента пациентов, направленных на лечение в медицинские организации федерального подчинения, необходим аудит историй болезней пациентов. Дефицит врачей-детских онкологов и низкий процент пациентов, выявленных активно, необходимо устранять с помощью реформирования подготовки медицинских кадров.

Ключевые слова: детская онкология, злокачественные новообразования, статистические показатели, заболеваемость, смертность, одногодичная летальность, Сибирский федеральный округ.

MEDICAL CARE FOR CHILDREN WITH CANCER IN THE SIBERIAN FEDERAL DISTRICT

M.Yu. Rykov^{1,2}

N.N. Blockhin Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia¹

Russia, 115478-Moscow, Kashirskoye Shosse, 24. E-mail: wordex2006@rambler.ru¹

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia²

Russia, 119991-Moscow, Trubetskaya Street, 8/2. E-mail: wordex2006@rambler.ru²

Abstract

Background. The analysis of the quality of medical care for children with cancer is based on statistical data. Evaluation of the results obtained is also the basis of the strategy for the development of medical care for this category of patients. **Aim:** analysis of the main parameters characterizing medical care for children with cancer in the Siberian Federal District. **Material and Methods.** The reports for 2017 on the health protection of 11/12 (91.6 %) constituent entities of the Russian Federation belonging to the Siberian Federal District were analyzed (Irkutsk Region did not provide data). **Results.** In 2017 the number of children aged 0–17 years was 3 722 470, the number of pediatric hospital beds for children with cancer (ages 0–17 years) was 260 (0,7 per 10,000), and the average number of bed-days per year was 342.2. In 3 (25 %) constituent entities of the Russian Federation, there were no departments of pediatric oncology and in 1 (8,3 %) there were no hospital beds for children with cancer. The number of physicians, who specialized in children's cancer was 49, of them 32 (65,3 %, 0,08 per 10,000, ages 0–17 years) had a certificate of a pediatric oncologist. In 1 (8,3 %) constituent entity of the Russian Federation, there were no pediatric oncologists. For children aged 0–17 years, the cancer incidence rate was 11.7 per 100,000 children, the cancer mortality rate was 2,2 per 100,000, and one-year mortality rate was 7,4 %. 188 (43,2 %) primary cancer patients were referred to medical institutions of the Federal District, and 17 (3,9 %) primary patients left the territory of the Russian Federation. **Conclusion.** The low incidence and mortality rates can be explained by the lost of reliable follow-up data. It is advisable to introduce electronic health record systems. For reliable estimation of hospital bed supply for children with cancer and percent of patients referred to medical centers for treatment, it is necessary to carry out a clinical audit. Deficiency of pediatric oncologists should be eliminated by reforming the training of medical personnel.

Key words: pediatric oncology, malignant tumors, morbidity, mortality, one-year mortality, Siberian Federal District.

Введение

Анализ качества медицинской помощи детям с онкологическими заболеваниями основывается на статистических данных. Оценка полученных результатов служит стратегии развития медицинской помощи данной категории пациентов. Немаловажна и координация деятельности региональных и федеральных властей, направленная на повышение преемственности в оказании различных этапов медицинской помощи, поскольку детская онкология – централизованная область, но вместе с тем маршрутизация пациентов должна быть рассредоточена по стране, то есть высокотехнологичные этапы лечения проводятся в медицинских организациях третьего (Б) уровня, рутинные – в условиях второго-третьего (А) уровней [1]. По этой причине особенно важна оценка уровня оказания медицинской помощи в субъектах Российской Федерации.

Цель исследования – анализ основных показателей, характеризующих медицинскую помощь детям с онкологическими заболеваниями в Сибирском федеральном округе.

Материал и методы

С 01.01.17 по 31.12.17 проведено экологическое исследование, в котором единицами анализа были агрегированные данные, а не отдельные индивиды [2]. Проанализированы оперативные отчеты органов исполнительной власти в сфере охраны здоровья 11 субъектов Российской Федерации (Министерство здравоохранения Иркутской области данные не предоставило), входящих в состав Сибирского федерального округа: республики Алтай, Бурятия, Тыва, Хакасия, Алтайский и Забайкальский края, Кемеровская, Новосибирская, Омская и Томская области. Отчеты содержали следующую информацию: численность детского населения (0–17 лет); число первичных пациентов; заболеваемость (на 100 тыс. детей 0–17 лет); общее число детей с онкологическими заболеваниями, состоящих на учете; число пациентов, выявленных активно; число умерших пациентов, из них из числа выявленных в 2017 г.; годовичная летальность (%); смертность (на 100 тыс. детей 0–17 лет); наличие в субъекте отделения детской онкологии; число детских онкологических коек;

число дней занятости койки в году; число врачей, оказывающих медицинскую помощь детям с онкологическими заболеваниями, из них число врачей, имеющих сертификаты детских онкологов; число пациентов, направленных на лечение в медицинские организации федерального подчинения; число пациентов, уехавших на лечение за пределы территории Российской Федерации.

На основании полученных данных автором рассчитаны показатели распространенности злокачественных новообразований (на 100 тыс. детей 0–17 лет), число детских онкологических коек и врачей-детских онкологов на 10 тыс. детей 0–17 лет, процент пациентов, госпитализированных в отделения детской онкологии и направленных на лечение в федеральные медицинские организации. Кроме того, автором рассчитаны показатели заболеваемости, смертности, одногодичной летальности также для контроля достоверности информации, содержащейся в отчетах.

В качестве объекта исследования выступали агрегированные данные: заболеваемость; смертность; одногодичная летальность; активная выявляемость; число врачей – детских онкологов и детских онкологических коек; среднее число дней занятости койки в году; процент пациентов, направленных на лечение в медицинские организации федерального подчинения и уехавших на лечение за пределы территории РФ.

Объем выборки, который не рассчитывался предварительно (рассчитать объем выборки невозможно, поскольку в исследование вошли все дети с морфологически подтвержденными злокачественными новообразованиями и попавшие в статистические отчеты), согласно представленным отчетам, максимально полный. Однако точно установить данный факт невозможно. Учитывая низкую заболеваемость в анализируемых субъектах, уместно предполагать, что часть пациентов не вошла в отчеты. Данный факт, а также отсутствие катамнеза пациентов не позволяют гарантировать достоверность данных об уровне заболеваемости, смертности и одногодичной летальности.

Статистическая обработка материала проводилась на персональном компьютере с использованием программы STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., США). За величину статистической значимости принимали значение $p < 0,05$. Оценка достоверности разности относительных частот проводилась по критерию Стьюдента.

Результаты

Основные показатели, характеризующие медицинскую помощь детям с онкологическими заболеваниями в субъектах, входящих в состав Сибирского федерального округа, представлены в таблице. Численность детского населения составила 3 722 470 чел. (0–17 лет). Максимальная численность детского населения отмечена в Красноярском

крае (615 254 чел.), минимальная – в Республике Алтай (66 434 чел.).

Отделений детской онкологии – 9. В 11 (50 %) субъектах отделения детской онкологии отсутствуют: медицинская помощь детям с онкологическими заболеваниями оказывается на койках, выделенных в составе других отделений многопрофильных детских клинических больниц. Детских онкологических коек – 260 (0,7 на 10 тыс. детского населения 0–17 лет). В 3 (27,3 %) субъектах (республики Тыва и Хакасия, Томская область) отделения детской онкологии отсутствуют, в 1 (9 %) субъекте (Республика Алтай) отсутствуют детские онкологические койки. Наименьшее число коек отмечено в Республике Хакасия (0,1 на 10 тыс. детей 0–17 лет), наибольшее – в Новосибирской области (1,4 на 10 тыс. детей 0–17 лет) (рис. 1).

Среднее число дней занятости койки в году составило 342,2 койко-дня. Наибольшее число дней занятости койки в году отмечено в Республике Бурятия (524,1), наименьшее – в Республике Тыва (261).

Врачей, оказывающих медицинскую помощь детям с онкологическими заболеваниями, – 49, из них 32 (65,3 %, 0,08 на 10 тыс. детей 0–17 лет) имеют сертификат врача-детского онколога. В 1 (9 %) субъекте (Республика Тыва) врачи-детские онкологи отсутствуют. Наибольшее число врачей-детских онкологов – в Забайкальском крае (0,1 на 10 тыс. детей 0–17 лет), наименьшее – в Алтайском крае (0,06 на 10 тыс. детей 0–17 лет) (рис. 1).

Первичных пациентов со злокачественными новообразованиями – 435 человек, пациентов, состоящих на диспансерном учете (достигших ремиссии и продолжающих лечение), – 2 590. Таким образом, заболеваемость в Сибирском федеральном округе в 2017 г. составила 11,7, распространенность – 69,6 (на 100 тыс. детей 0–17 лет).

Наибольшая заболеваемость и распространенность отмечены в Забайкальском крае (20,1 и 188 на 100 тыс. детей 0–17 лет соответственно), наименьшая заболеваемость – в Республике Хакасия (5 на 100 тыс. детей 0–17 лет), наименьшая распространенность – в Новосибирской области (18,8 на 100 тыс. детей 0–17 лет) (рис. 2, 3).

Умерло 82 пациента, из них из числа выявленных в 2017 г. – 32. Таким образом, смертность составила 2,2 на 100 тыс. детей 0–17 лет, одногодичная летальность – 7,4 %. Наибольшая смертность отмечена в Республике Алтай (4,5 на 100 тыс. детей 0–17 лет), наименьшая – в Новосибирской области (0,9 на 100 тыс. детей 0–17 лет) (рис. 2).

Наибольшая одногодичная летальность отмечена в Республике Алтай (27,3 %), в Новосибирской области одногодичная летальность составила 0 % (рис. 4).

31 (7,1 %) пациент выявлен активно. В ряде регионов (республики Бурятия и Хакасия) во время

Основные показатели, характеризующие медицинскую помощь детям с онкологическими заболеваниями в Сибирском федеральном округе в 2017 г.

Субъекты Российской Федерации	Показатели									
	Численность детского населения	Заболееваемость*/распространенность* ЗНО	Число первичных пациентов/общее число детей, состоящих на учете	Число пациентов, направленных на лечение в федеральные медицинские организации (%)	Число умерших пациентов/из числа выявленных в 2017 г.	Одно-годовая летальность, %	Смертность*	Число пациентов, выявленных активно (%)	Число отделений детской онкологии/число детских онкологических колек (**)/число дней занятости койки в году	Число врачей, оказывающих медицинскую помощь детям с онкологическими заболеваниями/из них имеют сертификат врача-детского онколога/,% (**)
Республика Алтай	66434	16,7/22,7	11/15	6 (54,5)/6 (54,5)	3/3	27,3	4,5	1 (9)	0/0	1/н/д
Республика Бурятия	253078	14,2/87,4	36/221	16 (44,4)/0	7/2	5,5	2,8	0	1/18 (0,7)/524,1	5/н/д
Республика Тыва	117600	8,5/35,9	10/42	10 (100)/5 (50)	2/2	20	1,7	2 (20)	0/2 (0,2)/261	2/0
Республика Хакасия	140000	5/52,8	7/74	7 (100)/0	2/0	0	1,4	0	0/2 (0,1)/340	1/1/100 (0,07)
Алтайский край	491634	13,6/116	67/570	67 (100)/3 (4,5)	22/6	9	4,5	7 (10,4)	1/24 (0,5)/ 296	5/3/60 (0,06)
Забайкальский край	268897	20,1/188	54/236	14 (25,9)/0	7/5	9,3	2,6	2 (3,7)	1/30 (1,1)/343,5	4/3/75 (0,1)
Красноярский край	615254	12,8/50,7	79/312	37 (46,8)/1 (1,3)	6/2	2,5	1	6 (7,6)	1/37 (0,6)/360	8/7/87,5 (0,1)
Иркутская область	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Кемеровская область	579797	9,3/75	54/434	6 (11,1)/0	8/6	11,1	1,4	3 (5,6)	1/30 (0,5)/н/д	4/4/100 (0,06)
Новосибирская область	553892	5,8/18,8	32/104	11 (34,3)/1 (3,1)	5/0	0	0,9	3 (9,4)	2/77 (1,4)/359	11/7/63,6 (0,1)
Омская область	412313	13,1/93,2	54/384	3 (5,6)/1 (1,9)	12/3	5,6	2,9	6 (11,1)	1/20 (0,5)/264,5	5/5/100 (0,1)
Томская область	223571	13,9/88,7	31/198	11 (35,5)/0	8/3	14,3	3,6	1 (3,2)	0/20 (0,9)/332	3/2/66,7 (0,08)
Итого	3722470	11,7/69,6	435/2590	188 (43,2)/17 (3,9)	82/32	7,4	2,2	31 (7,1)	8/260 (0,7)/342,2	49/32/65,3 (0,08)

Примечания: * – на 100 тыс. населения 0–17 лет, ** – на 10 тыс. населения 0–17 лет, н/д – нет данных.

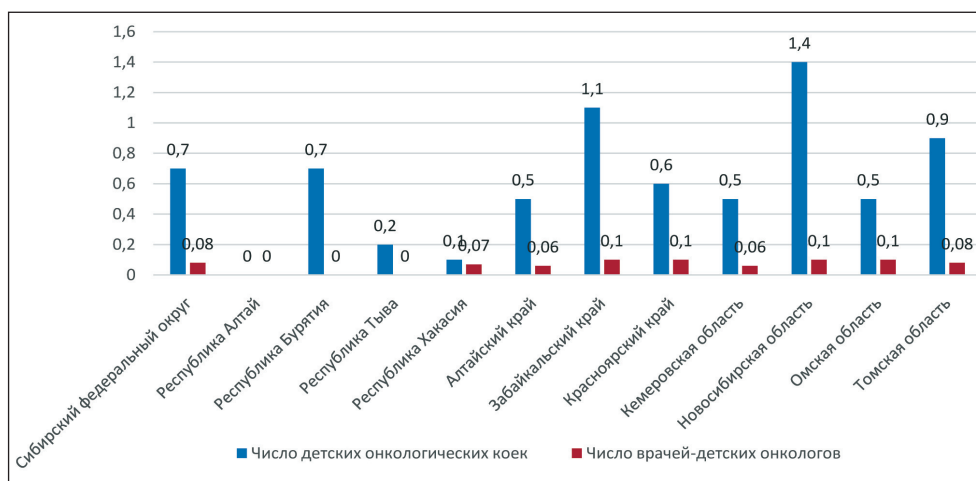


Рис. 1. Число врачей-детских онкологов и детских онкологических коек в субъектах Сибирского федерального округа (на 10 тыс. детей 0–17 лет)

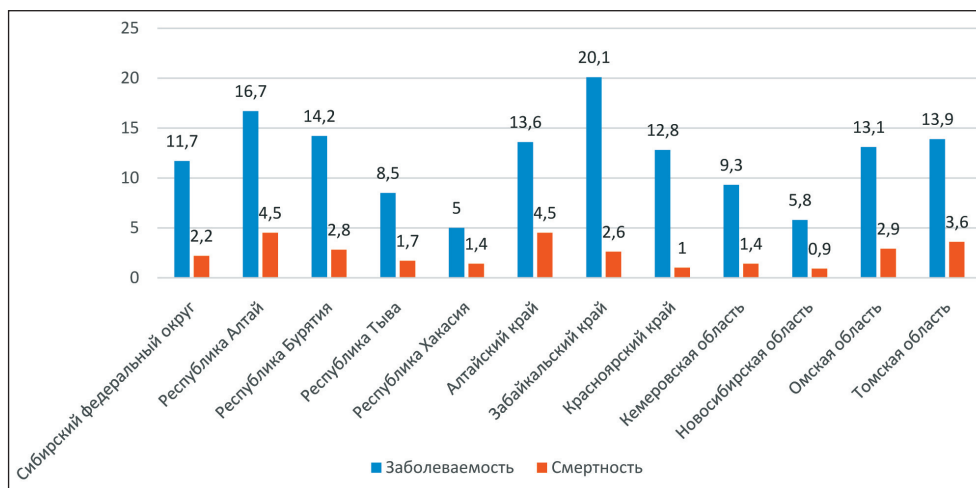


Рис. 2. Заболеваемость и смертность детей от злокачественных новообразований в субъектах Сибирского федерального округа в 2017 г. (на 100 тыс. детей 0–17 лет)

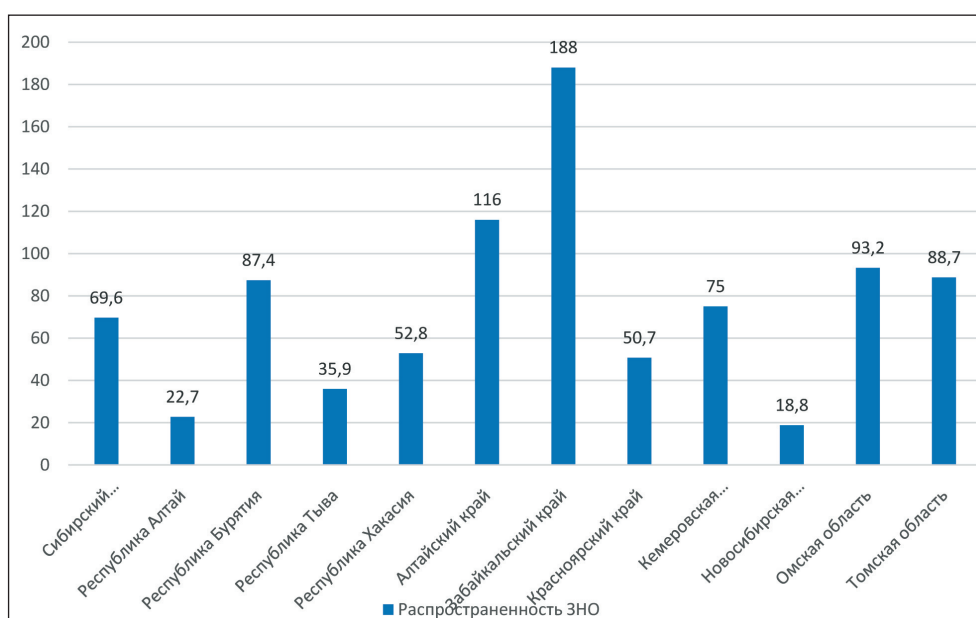


Рис. 3. Распространенность злокачественных новообразований в субъектах Сибирского федерального округа в 2017 г. (на 100 тыс. детей 0–17 лет)

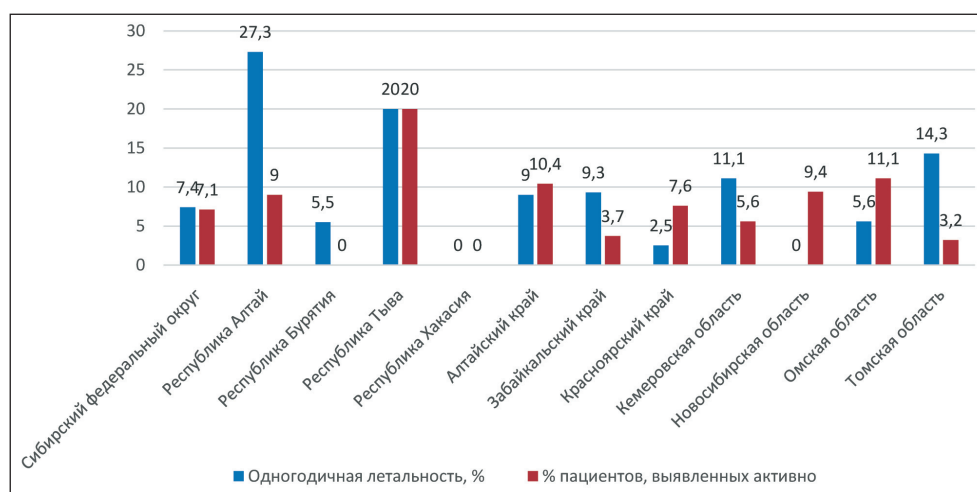


Рис. 4. Одногодичная летальность и пациенты, выявленные активно в субъектах Сибирского федерального округа в 2017 г. (%)

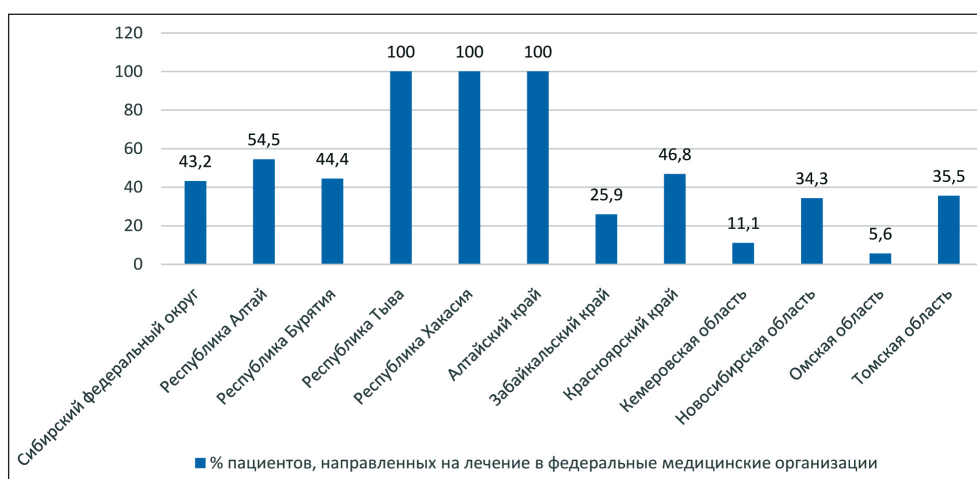


Рис. 5. Пациенты, направленные из субъектов Сибирского федерального округа на лечение в федеральные медицинские организации в 2017 г. (%)

плановых профилактических осмотров детского населения злокачественных новообразований выявлено не было. Максимальный процент пациентов, выявленных активно, отмечен в Республике Тыва (20 %) (рис. 4).

На лечение в медицинские организации федерального подчинения направлено 188 (43,2 %) пациентов. Наибольший показатель отмечен в республиках Тыва и Хакасия, Алтайском крае (100 %), наименьший – в Омской области (5,6 %) (рис. 5). На лечение за пределы территории Российской Федерации уехало 17 (3,9 %) первичных пациентов.

Обсуждение

Все оперативные отчеты содержали ошибки в расчетах некоторых показателей. В подавляющем большинстве отчетов или не приводятся, или приводятся ошибочные сведения о числе пациентов, достигших ремиссии, продолжающих лечение и выбывших из наблюдения.

Складывается впечатление, что содержащиеся в отчетах временные характеристики (среднее время, затраченное на установление диагноза, среднее время, прошедшее от момента верификации диагноза до начала лечения, и среднее время, затраченное на установление диагноза для умерших от злокачественных новообразований пациентов) не соответствуют действительности, поскольку весьма сомнительно, что средние величины, рассчитываемые, как известно, путем сложения показателей и деления полученного числа на число слагаемых, могут быть целыми числами, тогда как в большинстве отчетов приводятся значения 7,1 и 7 соответственно. При этом очевидно, что в ряде случаев морфологическая верификация диагноза занимает до 14 дней. Данные подозрения подтвердили и респонденты, сообщив в устных беседах, что данные заполнялись «на глаз», реальный анализ историй болезней не проводился.

По сравнению с 2013 г. уровень заболеваемости в Сибирском федеральном округе снизился

на 9,3 % (2013 г. – 12,9, 2017 г. – 11,7 на 100 тыс. детей 0–17 лет) [3].

Изменились «передовики» и «отстающие» и в Сибирском федеральном округе: места Томской области (2013 г. – 18,5, 2017 г. – 13,9 на 100 тыс. детей 0–17 лет) и Республики Тыва (2013 г. – 5,5, 2017 г. – 8,5 на 100 тыс. детей 0–17 лет) заняли Забайкальский край (20,1 на 100 тыс. детей 0–17 лет) и Республика Хакасия (5 на 100 тыс. детей 0–17 лет) [3].

Это свидетельствует о том, что выявляемость и учет за прошедшие 5 лет в некоторых субъектах повысились. Хотя заболеваемость существенно ниже, чем в странах США и Европы, но выше, чем в странах с низкой достоверностью статистических данных, например в республиках Средней Азии [4–6].

Обеспеченность населения детскими онкологическими койками несколько снизилась (2013 г. – 0,9, 2017 г. – 0,7 на 10 тыс. детей 0–17 лет) [3].

Обеспеченность населения врачами-детскими онкологами снизилась с 0,15 до 0,08. Некоторое снижение абсолютного числа врачей-детских онкологов, очевидно, связано с тем, что в 2017 г. в отчетах указывалось число врачей, имеющих сертификаты детских онкологов [3].

Доля пациентов, направленных на лечение в медицинские организации федерального подчинения, снизилась с 56 до 43,2 %. Оценить данный показатель достаточно сложно, поскольку детская онкология – централизованная область медицины и многие этапы лечения пациенты должны получать на базе федеральных медицинских организаций. По этой причине фактические значения представляются достаточно низкими. Хотя это лишь субъективная оценка, и она требует проведения аудита историй болезней пациентов [3].

Сравнить показатели распространенности, смертности, одногодичной летальности, активной выявляемости, среднее число дней занятости детской онкологической койки в году и процент пациентов, уехавших на лечение за пределы территории Российской Федерации, не представляется возможным, поскольку в 2013 г. отчеты данной информации не содержали.

Среднее число дней занятости койки в году находится на оптимальном уровне – 342,2 койко-дня. В некоторых субъектах данный показатель находится на чрезвычайно низком уровне. Например, в Республике Тыва – 261 койко-день, в Алтайском крае – 296, в Омской области – 264,5 койко-дня. В 4 (36,4 %) субъектах показатель средней занятости койки в году ниже 340 койко-дней. Это свидетельствует о том, что в данных субъектах отмечается

избыток детских онкологических коек, которые не заполняются.

В некоторых субъектах данный показатель находится на чрезвычайно высоком уровне и превышает 365 койко-дней. Например, в Республике Бурятия – 524,1 койко-дня. Очевидно, что в этих субъектах на детские онкологические койки госпитализируется несколько пациентов одновременно, что свидетельствует о нехватке в этих субъектах детских онкологических коек [7].

С целью устранения выявленных дефектов данных и причин, приводящих к появлению таковых, необходимо расширение использования цифровых технологий, создание электронной базы данных детей с онкологическими заболеваниями, которая исключит «субъективный» фактор как при составлении отчетов, так и во время выбора тактики лечения и маршрутизации пациентов [8, 9]. Хотя отчеты и подписывались руководителями (заместителями руководителей) органов исполнительной власти в сфере охраны здоровья субъектов РФ, в большинстве своем данные предоставлялись главными внештатными детскими специалистами онкологами, что не исключает субъективного фактора, следовательно, и ошибок при заполнении анкет, которые и были выявлены.

Из бесед с некоторыми составителями отчетов установлено, что часть из них не знала, как рассчитывать уровни заболеваемости, смертности и одногодичной летальности, другие же ссылались на нехватку времени для корректного заполнения анкет. Еще одной причиной респонденты называли отсутствие достоверных статистических данных (число первичных пациентов, общее число детей, состоящих на учете, и т. д.).

Заключение

Уровни заболеваемости злокачественными новообразованиями у детей в Сибирском федеральном округе существенно ниже таковых по сравнению со странами Европы и США, но выше, чем в странах с низкой достоверностью статистических данных. Это свидетельствует о сохраняющихся дефектах выявляемости. Смертность находится на приемлемом уровне, что, возможно, связано с отсутствием достоверных катамнестических данных. Процент пациентов, выявленных активно, необходимо повышать, в том числе с помощью широкого внедрения в клиническую практику алгоритма направления пациента на консультацию к врачу-детскому онкологу. Для достоверной оценки уровня обеспеченности населения детскими онкологическими койками необходим аудит историй болезней пациентов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Рыков М.Ю., Байбарина Е.Н., Чумакова О.В., Поляков В.Г. Эпидемиология злокачественных новообразований у детей в Российской Федерации: анализ основных показателей и пути преодоления дефектов статистических данных. Онкопедиатрия. 2017; 4 (3): 159–176.

[Rykov M.Y., Baibarina E.N., Chumakova O.V., Polyakov V.G. Cancer epidemiology in children in the Russian Federation: analysis of key indicators and ways to overcome the statistical data defects. Oncoepidemiology. 2017; 4 (3): 159–176. (in Russian)]. doi: 10.15690/onco.v4i3.1747.

2. Ласт Д.М. Эпидемиологический словарь. М., 2009. 316. [Last D.M. The epidemiological dictionary. Moscow; 2009. 316. (in Russian)].
3. Рыков М.Ю., Сусулёва Н.А., Чумакова О.В., Байбарина Е.Н., Поляков В.Г. Онкологическая заболеваемость детского населения Российской Федерации и его обеспеченность медицинской помощью (врачами, коечным фондом, диагностическими и лечебными технологиями): анализ статистических данных за 2013 г. Вопросы современной педиатрии. 2015; 14 (6): 686–691. [Rykov M.Y., Susulyova N.A., Chumakova O.V., Baybarina Y.N., Polyakov V.G. Cancer Incidence of Child Population of the Russian Federation and its Provision of Medical Care (Doctors, Bedspace, Diagnostic and Therapeutic Technologies): Analysis of Statistical Data for 2013. Current pediatrics. 2015; 14 (6): 686–691. (in Russian)]. doi: 10.15690/vsp.v14i6.1477.
4. Аксель Е.М. Злокачественные новообразования у детей: статистика заболеваемости и смертности детей в России и странах бывшего СССР в 2015 г. Евразийский онкологический журнал. 2017; 5 (2): 349–357. [Aksel' E.M. Malignant tumors in children: statistics of morbidity and mortality of children in Russia and the countries of the former USSR in 2015. Eurasian Journal of Oncology. 2017; 5(2): 349–357. (in Russian)].
5. Siegel R., Miller K., Jemal A. Cancer statistics, 2016. CA Cancer J Clin. 2016; 66 (1): 7–30. doi: 10.3322/caac.21332.
6. Cheung N.K., Dyer M.A. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. Nat Rev Cancer 2013; 13 (6): 397–411. doi: 10.1038/nrc3526.
7. Whelan J.S., Bielack S.S., Marina N., Smeland S., Jovic G., Hook J.M., Krailo M., Anninga J., Butterfass-Bahloul T., Böhlting T., Calaminus G., Capra M., Deffenbaugh C., Dhooge C., Eriksson M., Flanagan A.M., Gelderblom H., Goorin A., Gorlick R., Gosheger G., Grimer R.J., Hall K.S., Helmke K., Hogendoorn P.C., Jundt G., Kager L., Kuehne T., Lau C.C., Letson G.D., Meyer J., Meyers P.A., Morris C., Mottl H., Nadel H., Nagarajan R., Randall R.L., Schomberg P., Schwarz R., Teot L.A., Sydes M.R., Bernstein M.; EURAMOS collaborators. EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment. Ann Oncol 2015; 26 (2): 407–414. doi: 10.1093/annonc/mdl526.
8. Огошков П.А., Спичак И.И. Оптимизация организации региональной специализированной службы на модели детской онкологической службы в Челябинской области. Педиатрический вестник Южного Урала. 2015; 2: 5–13. [Ogoshkov P.A., Spichak I.I. Optimization model of regional organization specialized service on the example of children's cancer in the Chelyabinsk region. Pediatrichestki vestnik Yuzhnogo Urala. 2015; 2: 5–13. (in Russian)].
9. Смянов В.А., Тарасенко С.В., Смянова О.И., Демикова Н.В. Медико-социальная модель управления качеством медицинской помощи на уровне учреждения здравоохранения. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2014; 18 (189): 178–182. [Smyanov V.A., Tarasenko S.V., Smyanova O.I., Demikhova N.V. Medical and social model of management of health care quality for health care institution. Scientific bulletins of Belgorod State University. Series: Medicine. Pharmacia. 2014; 18 (189): 178–182. (in Russian)].

Поступила/Received 28.08.18
Принята в печать/Accepted 25.10.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Рыков Максим Юрьевич, кандидат медицинских наук, заместитель директора НИИ ДОГ, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; доцент кафедры онкологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет); главный внештатный детский специалист-онколог Минздрава России по Центральному федеральному округу (г. Москва, Россия). E-mail: wordex2006@rambler.ru. SPIN-код: 7652-0122. ORCID: 0000-0002-8398-7001. Researcher ID (WOS): R-9768-2016. Author ID (Scopus): 57190262153.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Автор объявляет, что у него нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHOR

Maxim Yu. Rykov, MD, PhD, Deputy Director, N.N. Blockhin Medical Research Center of Oncology; Assistant Professor of the Oncology Department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia). E-mail: wordex2006@rambler.ru. Researcher ID (WOS): R-9768-2016. Author ID (Scopus): 57190262153. ORCID: 0000-0002-8398-7001.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-13-20

УДК: 616.24-006.6-08-036.8:615.28:575.113

Для цитирования: Цыганов М.М., Дерюшева И.В., Родионов Е.О., Ефтеев Л.А., Миллер С.В., Ибрагимова М.К., Перминова Е.Е., Черемисина О.В., Фролова И.Г., Тузиков С.А., Литвяков Н.В. Экспрессия мРНК генов химиочувствительности как предиктор ответа на неоадъювантную химиотерапию при немелкоклеточном раке легкого. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 13–20. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-13-20.

For citation: Tsyganov M.M., Deryusheva I.V., Rodionov E.O., Efteev L.A., Miller S.V., Ibragimova M.K., Perminova E.E., Cheremisina O.V., Frolova I.G., Tuzikov S.A., Litviakov N.V. mRNA expression of chemosensitivity genes as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 13–20 – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-13-20.

ЭКСПРЕССИЯ мРНК ГЕНОВ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КАК ПРЕДИКТОР ОТВЕТА НА НЕОАДЪЮВАНТНУЮ ХИМИОТЕРАПИЮ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

М.М. Цыганов¹, И.В. Дерюшева¹, Е.О. Родионов¹, Л.А. Ефтеев¹,
С.В. Миллер¹, М.К. Ибрагимова¹, Е.Е. Перминова², О.В. Черемисина¹,
И.Г. Фролова¹, С.А. Тузиков¹, Н.В. Литвяков¹

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

Россия, г. Томск, 634009, пер. Кооперативный, 5. E-mail: TsyganovMM@yandex.ru¹

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия²

Россия, г. Томск, 634050, Московский тракт, 2. E-mail: elenape11@mail.ru²

Аннотация

Частота объективного ответа на неоадъювантную химиотерапию (НХТ) при лечении больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) в среднем составляет 16 %. В этой связи актуальным является поиск новых предсказательных факторов и маркеров, которые позволили бы с высокой вероятностью не только прогнозировать эффект НХТ, но и адекватно выбирать схему лечения для конкретного пациента. **Цель исследования** – изучение связи уровня экспрессии генов химиочувствительности с эффективностью неоадъювантной химиотерапии у больных немелкоклеточным раком легкого. **Материал и методы.** В исследование были включены 30 больных НМРЛ IIA–IIIB стадии. Из биопсийного материала нормальной и опухолевой тканей легкого до НХТ выделяли РНК. Уровень экспрессии генов химиочувствительности *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* оценивали при помощи обратнo-транскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR). **Результаты.** Анализ показателей экспрессии изучаемых генов позволил установить значимые различия в группах больных с разным эффектом НХТ. В 67 % случаев (10/15) отсутствие экспрессии *ERCC1* обуславливает наличие объективного ответа на лечение, по сравнению с группой, где присутствует экспрессия ($p < 0,05$). Наличие низкого (менее 0,2) и высокого (более 1,2) уровня экспрессии *BRCA1* сопряжено с низкими показателями эффективности НХТ, по сравнению с группой больных, у которых уровень эффективности находился в пределах нижней и верхней границы тертилей. Также статистически значимые различия были показаны для генов *GSTP1* и *RRM1*. **Заключение.** Таким образом, комплексная оценка экспрессии генов химиочувствительности важна не только с точки зрения понимания молекулярной биологии НМРЛ, но и для более точного определения эффекта НХТ и обнаружения потенциальных мишеней для лекарственных средств.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, неоадъювантная химиотерапия, эффективность химиотерапии, гены химиочувствительности, экспрессия генов.

mRNA EXPRESSION OF CHEMOSENSITIVITY GENES AS A PREDICTOR OF RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

M.M. Tsyganov¹, I.V. Deryusheva¹, E.O. Rodionov¹, L.A. Efteev¹, S.V. Miller¹,
M.K. Ibragimova¹, E.E. Perminova², O.V. Cheremisina¹, I.G. Frolova¹,
S.A. Tuzikov¹, N.V. Litviakov¹

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹
5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia. E-mail: TsyganovMM@yandex.ru¹
Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²
2, Moskovsky trakt, 634050-Tomsk, Russia. E-mail: elenape11@mail.ru²

Abstract

The objective response rate to neoadjuvant chemotherapy (NAC) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) is approximately 16 %. Therefore, the search for new predictive factors and markers that could precisely predict the NAC response and be relevant to the choice of the adequate treatment policy is of utmost importance. **The purpose of the study** was to analyze the relationship between the expression levels of chemosensitivity genes and NAC response in patients with non-small cell lung cancer. **Material and Methods.** The study included 30 patients with stage IIa/IIb NSCLC. Total RNA was isolated from normal and tumor lung tissue samples prior to NAC. The expression level of chemosensitivity genes, such as *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, and *GSTP1* was evaluated by real-time reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR). **Results.** A significant difference in the expression levels of the studied genes between patients with different NAC response was found. The objective response to therapy was observed in 67 % (10/15) of patients having no *ERCC1* expression compared to those with *ERCC1* expression ($p < 0.05$). Low (less than 0.2) and high (more than 1.2) *BRCA1* expression levels were associated with low rates of NAC response compared with patients whose expression level was between the lower and upper quartiles. Statistically significant differences were shown for the *GSTP1* and *RRM1* genes. **Conclusion.** A comprehensive assessment of the expression of chemosensitivity genes is important not only in terms of understanding heterogeneity and complexity of the molecular biology of NSCLC, but also for more accurate prediction of response to NAC and identification of potential drug targets.

Key words: non-small cell lung cancer, neoadjuvant chemotherapy, response to chemotherapy, chemosensitivity genes, gene expression.

Введение

В настоящее время установлено, что эффективность применяемой НХТ у больных немелкоклеточным раком легкого сильно варьирует [1–3]. В исследовании K. Pistors et al. [4] сообщается о 12 % больных, у которых достигнут полный ответ (9 из 73), J.A. Roth et al. [5] показали отсутствие эффективности НХТ у 28 пациентов, R. Rosell et al. [6] наблюдали положительный ответ на лечение у 3 % (1 из 30) больных НМРЛ. Показатель полного патологического ответа, описанный в данных исследованиях, составляет 4 % (диапазон – 0–16 %). Таким образом, частота объективного ответа на неoadъювантную химиотерапию при лечении пациентов с НМРЛ остается сравнительно невысокой.

Исходя из этого, основным трендом в современной онкологии является понимание молекулярно-биологических изменений в опухоли, поиск их ассоциаций с эффективностью лечения и прогнозом заболевания. Исследование экспрессии молекулярно-биологических маркеров может позволить выявить не только новые диагностические и прогностические факторы эффективности

лечения, но и более персонализированно подойти к назначению рациональных режимов комбинированной химиотерапии и таргетных препаратов [7, 8]. Особое внимание многих исследователей привлекает возможность оценки чувствительности опухоли к определенным химиопрепаратам. При немелкоклеточном раке легкого ключевыми генами химиочувствительности являются *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1* и др., которые определяют чувствительность опухолевых клеток к отдельным химиопрепаратам. В этой связи актуальным и перспективным является поиск новых предсказательных факторов, основанных на экспрессии генов химиочувствительности, поскольку их уровень патофизиологически связан с ответом на тот или иной препарат посредством участия в метаболизме лекарств в клетках опухоли, трансмембранном транспорте, взаимодействии с мишенью, а также в механизмах реализации апоптоза и репарации [9].

Цель исследования – изучение связи уровня экспрессии генов химиочувствительности с эффективностью неoadъювантной химиотерапии у больных немелкоклеточным раком легкого.

Материал и методы

В исследование включены 30 больных НМРЛ ПА–ПВ (T1–4N0–3M0) стадии с морфологически верифицированным диагнозом (табл. 1), которые находились на лечении в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ. Выборка представлена пациентами мужского пола. Статус курения: положительный для всех. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. [10] (исправленной в 1975 г. и 1983 г.) и с разрешения локального этического комитета института, все пациенты подписали информированное согласие на исследование.

Всем пациентам проведено 2 курса неoadъювантной химиотерапии по схеме винорелбин 25 мг/м² (1-й и 8-й дни)/карбоплатин АУС 6 (во 2-й день) с интервалом 3 нед и последующей оценкой эффекта. Эффективность НХТ была оценена с помощью шкалы RECIST. Химиотерапия проводилась при удовлетворительном общем состоянии и лабораторных показателях пациентов без отклонений от нормы.

В качестве исследуемого материала был использован биопсийный материал нормальной и опухолевой ткани (~10 мм³) легкого, который помещали в раствор RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, USA). После 24-часовой инкубации при +4 °C образцы биоматериала сохраняли при температуре –80 °C для дальнейшего выделения РНК.

РНК выделяли из 30 парных образцов нормальной ткани легкого и опухоли, с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. На спектро-

фотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделения РНК. Концентрация РНК составила от 100 до 500 нг/мкл, $A_{260}/A_{280}=1,85–2,05$; $A_{260}/A_{230}=1,80–2,08$. Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе Tape Station (Agilent Technologies, USA). RIN составил 6,6–9,2. Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора реагентов для синтеза первой цепи кДНК RevertAid™ RT (Thermo Fisher Scientific, USA) со случайными гексануклеотидами.

Уровень экспрессии генов: *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* оценивали при помощи обратнo-транскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) по технологии TaqMan на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Australia). ПЦР ставился в трех репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂, 19 SE buffer (67 мМ Tris–HCl pH 8,8 при 25 °C, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20), 2,5 ед HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг кДНК. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94 °C, 10 мин – предварительная денатурация; 40 цикла – 1 шаг 94 °C, 10 сек и 2 шаг 20 сек – при температуре 60 °C. Уровень экспрессии генов: *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* оценивали при помощи обратнo-транскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) по технологии TaqMan на амплифика-

Таблица 1

Характеристика клинического материала

Клинико-морфологические параметры		Количество больных (n=30)
Возраст	≤50 лет	4 (13,3 %)
	>50 лет	26 (86,7 %)
Размер опухоли	T1	3 (10 %)
	T2	5 (16,7 %)
	T3	17 (56,7 %)
	T4	5 (16,7 %)
	N0	5 (16,7 %)
Лимфогенное метастазирование	N1	15 (50,0 %)
	N2	9 (30,0 %)
	N3	1 (3,3 %)
Клинико-анатомическая форма рака легкого	Центральный	20 (66,7 %)
	Периферический	10 (33,3 %)
Гистологический тип	Плоскоклеточный рак	24 (80,0 %)
	Аденокарцинома	6 (20,0 %)
	Полная регрессия	0 (0,0 %)
Эффект НХТ	Частичная регрессия	12 (40,0 %)
	Стабилизация	18 (60,0 %)
	Прогрессирование	0 (0,0 %)
Объем операции	Пневмонэктомия	12 (40,0 %)
	Лобэктомия	18 (60,0 %)

tope Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Australia). Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>) (табл. 2). Синтез олигонуклеотидов и зондов осуществлялся в компании ДНК-синтез (Россия). Остальные манипуляции и методика оценки относительной экспрессии генов описаны ранее [11].

В качестве результата оценивался уровень экспрессии исследуемых генов относительно гена-рефери *GAPDH* и нормальной ткани легкого. Экспрессия была оценена с помощью метода Pfaffl и формула (1) использовалась для того, чтобы определить отношение экспрессии между образцом и калибратором:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct, \text{target}(\text{calibrator} - \text{test})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct, \text{ref}(\text{calibrator} - \text{test})}}, \quad (1)$$

где E – эффективность реакции; Ct – пороговый цикл генов мишеней (target) и гена-реферри (ref). $\Delta Ct, \text{target}(\text{calibrator} - \text{test})$ = Ct гена мишени в

калибраторе минус Ct гена мишени в опытном образце; $\Delta Ct, \text{ref}(\text{calibrator} - \text{test})$ = Ct гена-реферри в калибраторе минус Ct гена-реферри в опытном образце [12]. Уровень экспрессии измерялся в условных единицах.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., USA). Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое и среднюю квадратичную ошибку. Деление показателей уровня экспрессии изучаемых генов осуществлялось по тертилям при помощи базовой статистики. Для проверки гипотезы о значимости различий признака использовали критерий Вилкоксона – Манна – Уитни. Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>).

Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования мы изучили связь начального уровня экспрессии ис-

Таблица 2

Последовательность праймеров и проб исследованных генов

Ген	Ампликон (bp)	Последовательность
<i>GAPDH</i> NM_002046.3	124 bp	F 5'-gccagccgagccacatc-3' R 5'-ggcaacaatatccactttaccaga-3' Probe 5'-cgccaatacgaaccaatccg-3'
<i>RRM1</i> NM_001033.3	94 bp	F 5'-actaagcaccctgactatctatcc-3' R 5'-cttccatcacatcactgaacacttt-3' Probe 5'-cagccaggatcgctgtctctaacttgca-3'
<i>ERCC1</i> XM_005258638.1 Все транскрипты	121 bp	F 5'-ggcgacgtaattcccgaacta-3' R 5'-agtcttccccagcgtctgc-3' Probe 5'-accacaacctgcaccagactacatcca-3'
<i>BRCA1</i> NM_007294.3 NM_007297.3 NM_007298.3 NM_007299.3 NM_007300.3	107 bp	F 5'-acagctgtgtgtgtctctgtg-3' R 5'-cattgtcctctgtccaggcatc-3' Probe 5'-catcattcacccttggcacagggtg-3'
<i>TOP1</i> NM_003286.2	97 bp	F 5'-ggcgagtgaactaaggataatgaa-3' R 5'-tgatattcttaagggtacagcgaa-3' Probe 5'-accattttcccatcatccttctgtctgagc-3'
<i>TOP2A</i> NM_001067.3	75 bp	F 5'-agtcgctttcagggttcttgag-3' R 5'-tttcatttacagggtgcaatgg-3' Probe 5'-cccttcacgaccgtcaccatgga-3'
<i>TUBB3</i> NM_006086.3	71 bp	F 5'-gggccaagttctgggaagtc-3' R 5'-cgagtcgccacgtagttg-3' Probe 5'-atgagcatggcatcgaccccgagc-3'
<i>TYMS</i> NM_001071.2	91 bp	F 5'-tctggaagggtgttttga-3' R 5'-tcccagatttccactccctt-3' Probe 5'-tcttttagcatttggatcccttga-3'
<i>GSTP1</i> NM_000852.3	84 bp	F 5'-ctgggtggacatggtgaatgac-3' R 5'-ctgtccgcctcatagttg-3' Probe 5'-aggacctccgctgcaaatcatctc-3'

Примечания: все пробы – FAM →BHQ1; NM – номер последовательности РНК в NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>); bp – base pair; F – прямой праймер; R – обратный праймер; Probe – зонд.

следуемых генов с эффектом неоадьювантной химиотерапии. Статистически значимые различия были установлены только для гена *TOP2a* ($p=0,03$). Начальный высокий уровень экспрессии данного гена ($3,87 \pm 1,50$) обуславливал эффект НХТ, расцененный как стабилизация, тогда как у пациентов с частичной и полной регрессией уровень экспрессии *TOP2a* был равен $1,05 \pm 0,77$. При этом важно отметить, что экспрессия мРНК является вариабельной величиной, таким образом, для более точного определения связи экспрессии генов химиочувствительности с эффектом НХТ при помощи статистического анализа пациенты были разделены на тертили (табл. 3).

Для *ERCC1* было установлено, что отсутствие экспрессии данного гена в опухоли легкого до начала проведения НХТ в 67 % случаев (10/15) обуславливает наличие объективного ответа на лечение, по сравнению с группой, где присутствует экспрессия (группа экспрессии от 0 до 0,4, $p=0,06$, и группа экспрессии более 0,4, при $p=0,02$). Полученный результат согласуется с данными литературы, высокая экспрессия генов репарации и, в частности, *ERCC1* определяет устойчивость опухоли легкого к препаратам платины [13]. В недавних исследованиях была показана корреляционная зависимость между экспрессией *ERCC1* и

реакцией на химиотерапию препаратами платины при раке желудка, печени, раке прямой и ободочной кишки и раке легкого [14]. D. Yan et al. показали, что при НМРЛ ингибирование экспрессии *ERCC1* связано с благоприятным прогнозом лечения [15]. Подобное исследование было проведено M. Tiseo et al., которые продемонстрировали, что у пациентов с низкой или нулевой экспрессией *ERCC1* в опухоли наблюдались высокая эффективность лечения НМРЛ цисплатином и высокая выживаемость [16].

Подобный результат был получен при анализе экспрессии гена *GSTP1*, который активно участвует в метаболизме препаратов платины, в частности карбоплатина, его экспрессия напрямую связана с клинической реакцией на химиотерапевтическое лечение [17]. Согласно нашим результатам, экспрессия *GSTP1* в опухоли выше 1,0 сопряжена с низкой эффективностью НХТ (80 % пациентов со стабилизацией; 8 случаев из 10), по сравнению с группой больных с низким уровнем экспрессии данного гена (менее 0,4), у которых в 83 % случаев наблюдается объективный ответ на лечение.

Далее нами было установлено, что наибольшая эффективность НХТ наблюдается в группе больных со средним значением (0,3–1,0) экспрессии гена *RRM1* (табл. 3). В 10 случаях из 12 (83 %)

Таблица 3

Ответ на неоадьювантную химиотерапию в зависимости от групп экспрессии генов химиочувствительности

Ген	Группа экспрессии	n	Эффект НХТ		Группа 1/2	p-value	
			ЧР + ПР	СТ		Группа 1/3	Группа 2/3
<i>RRM1</i>	<0,3	5	2	3	0,53	0,55	0,04
	0,3–1,0	12	2	10			
	>1	7	5	2			
<i>TYMS</i>	<0,1	3	0	3	0,26	1,00	0,65
	0,1–1,2	16	7	9			
	>1,2	7	2	5			
<i>GSTP1</i>	<0,4	6	5	1	0,11	0,03	0,38
	0,4–1,0	12	5	7			
	>1	10	2	8			
<i>TUBB3</i>	<0,5	7	2	5	0,64	1,00	1,00
	0,5–3,8	15	7	8			
	>3,8	7	3	4			
<i>ERCC1</i>	0	15	10	5	0,06	0,02	1,00
	0–0,4	7	1	6			
	>0,4	8	1	7			
<i>BRCA1</i>	<0,2	10	7	3	3e-4	1,00	4e-4
	0,2–1,2	14	0	14			
	>1,2	6	5	1			
<i>TOP1</i>	0	7	4	3	0,16	0,61	0,60
	0–0,4	10	2	8			
	>0,4	8	3	5			
<i>TOP2a</i>	<0,01	7	5	2	0,07	0,10	1,00
	0,01–3,9	12	3	9			
	>3,9	6	1	5			

Примечания: ЧР + ПР – частичная + полная регрессия опухолевого процесса; СТ – стабилизация опухолевого процесса.

показан хороший ответ на лечение, по сравнению с группой экспрессии более 1 ($p=0,04$). Следует отметить, что ферменты рибонуклеотидредуктазы (*RRM1/RRM2*) играют важную роль в ответе опухоли на действие таких химиопрепаратов, как 5-фторурацил и гемцитабин. Установлено, что высокая экспрессия *RRM1* ($p<0,05$) статистически значимо коррелирует с чувствительностью к гемцитабину и 5-фторурацилу [18]. G. Vepler et al. высказали предположение о том, что предварительная оценка экспрессии генов-маркеров *RRM1* и *ERCC1* может являться хорошим фактором выбора оптимальной схемы химиотерапии, а также влиять на отдаленные результаты лечения [19].

Интересный результат был получен для гена *BRCA1*, который участвует в репарации ДНК внутри клетки (PubMed; OMIM 113705), а также является показателем химиорезистентности к препаратам платины [20]. В нашем исследовании было показано, что наличие низкого (менее 0,2) и высокого (более 1,2) уровня экспрессии сопряжено с низкими показателями эффективности НХТ, по сравнению с группой больных, чей уровень находился в пределах нижней и верхней границы тертилей. При низкой экспрессии у 70 % (7/10) больных, а в группе пациентов с уровнем более 1,2 – у 83 % (5/6) наблюдалась стабилизация опухолевого процесса, тогда как группа больных с уровнем 0,2–1,2 в 100 % случаев отвечала на неoadъювантную химиотерапию ($p=3e-4$ и $p=4e-4$ соответственно, табл. 3). В исследовании M. Taroni et al. было показано, что пациенты с низким уровнем экспрессии имели лучший результат лечения и более высокие показатели выживаемости, по сравнению с высокими уровнями *BRCA1* [20]. Полученный результат наших исследований можно объяснить тем, что при применении препаратов,

действующих на микротрубочки (в частности, винорелбина), вызывается индукция экспрессии гена *BRCA1*, что приводит к активации контрольной точки митоза и последующей клеточной гибели [21, 22]. При этом дефицит продукта гена *BRCA1*, наоборот, приводит к тому, что апоптоз опухолевых клеток под действием цитостатиков растительного происхождения не индуцируется.

Для других генов химиочувствительности статистически значимой связи с эффективностью НХТ установлено не было, кроме генов группы топоизомераз (*TOP1* и *TOP2a*) (на уровне выраженной тенденции).

Заключение

Персонализация химиотерапии остается актуальной проблемой в лечении немелкоклеточного рака легкого, решение которой может способствовать значительному повышению эффективности лечения. Большинство исследований сосредоточено на изучении связи экспрессии генов химиочувствительности с прогнозом заболевания. В настоящем исследовании была изучена экспрессия генов химиочувствительности в опухолевой ткани легкого до проведения неoadъювантной химиотерапии и оценена связь с эффективностью лечения. Анализ полученных результатов позволил установить значимые различия в эффективности лечения в группах больных с разным уровнем экспрессии *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1* и *GSTP1*. Представленное исследование продолжается.

Таким образом, комплексная оценка экспрессии генов химиочувствительности важна не только с точки зрения понимания молекулярной биологии НМРЛ, но и для более точного определения эффекта НХТ и обнаружения потенциальных мишеней для лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Felip E., Rosell R., Maestre J.A., Rodríguez-Paniagua J.M., Morán T., Astudillo J., Alonso G., Borro J.M., González-Larriba J.L., Torres A., Camps C., Gujjarro R., Isla D., Aguiló R., Alberola V., Padilla J., Sánchez-Palencia A., Sánchez J.J., Hermosilla E., Massuti B.; Spanish Lung Cancer Group. Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jul 1; 28 (19): 3138–45. doi: 10.1200/JCO.2009.27.6204.
2. Pisters K.M., Vallieres E., Crowley J.J., Franklin W.A., Bunn Jr.P.A., Ginsberg R.J., Putnam Jr.J.B., Chansky K., Gandara D. Surgery with or without preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer: Southwest Oncology Group Trial S9900, an intergroup, randomized, phase III trial. *J Clin Oncol.* 2010 Apr 10; 28 (11): 1843–9. doi: 10.1200/JCO.2009.26.1685.
3. Scagliotti G.V., Pastorino U., Vansteenkiste J.F., Spaggiari L., Facciolo F., Orlowski T.M., Maiorino L., Hetzel M., Leschinger M., Visseren-Grul C., Torri V. Randomized phase III study of surgery alone or surgery plus preoperative cisplatin and gemcitabine in stages IB to IIIA non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2012 Jan 10; 30 (2): 172–8. doi: 10.1200/JCO.2010.33.7089.
4. Pisters K., Kris M.G., Gralla R.J., Zaman M.B., Heelan R.T., Martini N. Pathologic complete response in advanced non-small-cell lung cancer following preoperative chemotherapy: implications for the design of future non-small-cell lung cancer combined modality trials. *J Clin Oncol.* 1993 Sep; 11 (9): 1757–62.

5. Roth J.A., Fossella F., Komaki R., Ryan M.B., Putnam J.B. Jr., Lee J.S., Dhingra H., De Caro L., Chasen M., Mc Gavran M. A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1994 May 4; 86 (9): 673–80.
6. Rosell R., Gomez-Codina J., Camps C., Maestre J., Padilla J., Canto A., Mate J.L., Li S., Roig J., Olazabal A. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 1994 Jan 20; 330 (3): 153–8.
7. O'Byrne K.J., Gatzemeier U., Bondarenko I., Barrios C., Eschbach C., Martens U.M., Hoiko Y., Kortsik C., Paz-Ares L., Pereira J.R., von Pawel J., Ramlau R., Roh J.K., Yu C.T., Stroh C., Celik I., Schueler A., Pirker R. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol.* 2011 Aug; 12 (8): 795–805. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70189-9.
8. Гервас П.А., Литвяков Н.В., Попова Н.О., Добродеев А.Ю., Тарасова А.С., Юмов Е.Л., Иванова Ф.Г., Черемисина О.В., Афанасьев С.Г., Гольдберг В.Е., Чердынцева Н.В. Проблемы и перспективы совершенствования молекулярно-генетической диагностики для назначения таргетных препаратов в онкологии. *Сибирский онкологический журнал.* 2014; 2: 46–55. [Gervas P.A., Litviakov N.V., Popova N.O., Dobrodeev A.Yu., Tarasova A.S., Yumov E.L., Ivanova F.G., Cheremisinina O.V., Afanasyev S.G., Goldberg V.E., Cherdyntseva N.V. Problem and perspective to improve molecular testing to choose appropriate target therapy. *Siberian Journal of Oncology.* 2014; 2: 46–55. (in Russian)].

9. Цыганов М.М., Родионов Е.О., Миллер С.В., Литвяков Н.В. Обоснование использования экспрессионных маркеров для персонализации химиотерапии рака лёгкого. Антибиотики и химиотерапия. 2015; 60 (9–10): 38–45. [Tsyanov M.M., Rodionov E.O., Miller S.V., Litvyakov N.V. Substantiation of expressive markers use to personalize lung cancer chemotherapy. Antibiotics and Chemotherapy. 2015; 60 (9–10): 38–45. (in Russian)].
10. 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. Cancer. 2004 Jun 15; 100 (12): 2512–32.
11. Юмов Е.Л., Цыганов М.М., Миллер С.В., Литвяков Н.В., Полищук Т.В., Миллер С.В., Родионов Е.О., Тузиков С.А. Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости и монорезистентности при немелкоклеточном раке лёгкого. Сибирский онкологический журнал. 2013; 1: 16–22. [Yumov E.L., Tsyanov M.M., Miller S.V., Litvyakov N.V., Polishchuk T.V., Miller S.V., Rodionov E.O., Tuzikov S.A. Expression of multidrug resistance and monoresistance genes in non-small cell lung cancer. Siberian Journal of Oncology. 2013; 1: 16–22. (in Russian)].
12. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1; 29 (9): e45.
13. Simon G.R., Schell M.J., Begum M., Kim J., Chiappori A., Haura E., Antonia S., Bepler G. Preliminary indication of survival benefit from ERCC1 and RRM1-tailored chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer: Evidence from an individual patient analysis. Cancer. 2012 May 1; 118 (9): 2525–31. doi: 10.1002/cncr.26522.
14. De Dosso S., Zanellato E., Nucifora M., Boldorini R., Sonzogni A., Biffi R., Fazio N., Bucci E., Beretta O., Crippa S. ERCC1 predicts outcome in patients with gastric cancer treated with adjuvant cisplatin-based chemotherapy. Cancer Chemother Pharmacol. 2013 Jul; 72 (1): 159–65. doi: 10.1007/s00280-013-2181-2.
15. Yan D., Wei P., An G., Chen W. Prognostic potential of ERCC1 protein expression and clinicopathologic factors in stage III/N2 non-small cell lung cancer. J Cardiothorac Surg. 2013 Jun 10; 8: 149. doi: 10.1186/1749-8090-8-149.
16. Tiseo M., Bardi P., Bortesi B., Boni L., Boni C., Baldini E., Grossi F., Recchia F., Zanelli F., Fontanini G., Naldi N., Campanini N., Azzoni C., Bardi C., Arduini A.; Bio-FAST trial group. ERCC1/BRCA1 expression and gene polymorphisms as prognostic and predictive factors in advanced NSCLC treated with or without cisplatin. Br J Cancer. 2013 Apr 30; 108 (8): 1695–703. doi: 10.1038/bjc.2013.127.
17. Zhou F., Yu Z., Jiang T., Lv H., Yao R., Liang J. Genetic polymorphisms of GSTP1 and XRCC1: prediction of clinical outcome of platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Swiss Med Wkly. 2011 Oct 19; 141: w13275. doi: 10.4414/smww.2011.13275.
18. Yu Y., Ding S., Liang Y., Zheng Y., Li W., Yang L., Zheng X., Jiang J. Expression of ERCC1, TYMS, TUBB3, RRM1 and TOP2A in patients with esophageal squamous cell carcinoma: A hierarchical clustering analysis. Exp Ther Med. 2014 Jun; 7 (6): 1578–1582. doi: 10.3892/etm.2014.1659.
19. Bepler G., Williams C., Schell M.J., Chen W., Zheng Z., Simon G., Gadgeel S., Zhao X., Schreiber F., Brahmer J., Chiappori A., Tanvetyanon T., Pinder-Schenck M., Gray J., Haura E., Antonia S., Fischer J.R. Randomized international phase III trial of ERCC1 and RRM1 expression-based chemotherapy versus gemcitabine/carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2013 Jul 1; 31 (19): 2404–12. doi: 10.1200/JCO.2012.46.9783.
20. Taron M., Rosell R., Felip E., Mendez P., Souglakos J., Ronco M.S., Queralt C., Mayo J., Sanchez J.M., Sanchez J.J., Maestre J. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. Hum Mol Genet. 2004 Oct 15; 13 (20): 2443–9. doi: 10.1093/hmg/ddh260.
21. Mullan P.B., Quinn J.E., Gilmore P.M., McWilliams S., Andrews H., Gervin C., McCabe N., McKenna S., White P., Young-Han S. BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. Oncogene. 2001 Sep 27; 20 (43): 6123–31. doi: 10.1038/sj.onc.1204712.
22. Quinn J.E., Kennedy R.D., Mullan P.B., Gilmore P.M., Carty M., Johnston P.G., Harkin D.P. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res. 2003; 63 (19): 6221–6228.

Поступила/Received 24.01.18
Принята в печать/Accepted 03.04.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Цыганов Матвей Михайлович, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории онковирусологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: TsyanovMM@yandex.ru. SPIN-код: 1253-0240. Researcher ID (WOS): A-7212-2014. Author ID (Scopus): 55366377400. ORCID: 0000-0001-7419-4512.

Дерюшева Ирина Валерьевна, младший научный сотрудник лаборатории онковирусологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: Irkin_097@mail.ru. SPIN-код: 5560-6131. Researcher ID (WOS): Q-5607-2017. Author ID (Scopus): 57194535404. ORCID: 0000-0002-9568-3371.

Родионов Евгений Олегович, кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник торакального отделения, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: scorpion1612@list.ru. SPIN-код: 7650-2129. Researcher ID (WOS): B-7280-2017. Author ID (Scopus): 57189622130. ORCID: 0000-0003-4980-8986.

Ефтеев Леонид Александрович, младший научный сотрудник торакального отделения, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: efteyco@rambler.ru. ORCID: 0000-0002-9054-0742.

Миллер Сергей Викторович, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник торакального отделения, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: miller_sv@sibmail.com. SPIN-код: 6510-9849. Researcher ID (WOS): C-8970-2012. Author ID (Scopus): 56525429400. ORCID: 0000-0002-5365-9840.

Ибрагимова Марина Константиновна, младший научный сотрудник лаборатории онковирусологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: imk1805@yandex.ru. SPIN-код: 2340-1628. Researcher ID (WOS): C-8609-2012. Author ID (Scopus): 57130579200. ORCID: 0000-0001-8815-2786.

Перминова Елена Евгеньевна, студентка, Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Россия). E-mail: elenape11@mail.ru.

Черемисина Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, заведующая эндоскопическим отделением, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: CheremisinaOV@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 9579-2691. AuthorID (РИНЦ): 562287. ResearcherID (WOS): C-9259-2012. Author ID (Scopus): 6602197938. ORCID: 0000-0001-7234-4708.

Фролова Ирина Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением лучевой диагностики, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: frolovaIG@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 9800-9777. Researcher ID (WOS): C-8212-2012. Author ID (Scopus): 7006413170. ORCID: 0000-0001-5227-006X.

Тузиков Сергей Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий торакальным отделением, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: tuzikovSA@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 5662-6431. Researcher ID (WOS): D-1176-2012. Author ID (Scopus): 6507842873. ORCID: 0000-0002-0884-1838.

Литвяков Николай Васильевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией онковирусологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: nvlitv72@yandex.ru. SPIN-код: 2546-0181. Researcher ID (WOS): C-3263-2012. Author ID (Scopus): 6506850698. ORCID: 0000-0002-0714-8927.

Финансирование

Исследования выполнены при поддержке программы «Участники молодежного научно-инновационного конкурса (УМНИК)» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. Договор (Соглашение) №11783 ГУ/2017 от 3 июля 2017 г. Тема: «Разработка способа предсказания эффективности послеоперационной химиотерапии у больных раком легкого».

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Matvey M. Tsyganov, PhD, Researcher, Laboratory of Viral Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: TsyganovMM@yandex.ru. Researcher ID (WOS): A-7212-2014. Author ID (Scopus): 55366377400. ORCID: 0000-0001-7419-4512.

Irina V. Deryusheva, Junior Researcher, Laboratory of Viral Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: Irkin_097@mail.ru. Researcher ID (WOS): Q-5607-2017. Author ID (Scopus): 57194535404. ORCID: 0000-0002-9568-3371.

Evgeny O. Rodionov, MD, PhD, Junior Researcher, Thoracic Surgery Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: scorpion1612@list.ru. Researcher ID (WOS): B-7280-2017. Author ID (Scopus): 57189622130. ORCID: 0000-0003-4980-8986.

Leonid A. Efteev, MD, Junior Researcher, Thoracic Surgery Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: efteyco@rambler.ru. ORCID: 0000-0002-9054-0742.

Sergey V. Miller, MD, DSc, Leading Researcher, Thoracic Surgery Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: miller_sv@sibmail.com. Researcher ID (WOS): C-8970-2012. Author ID (Scopus): 56525429400. ORCID: 0000-0002-5365-9840.

Marina K. Ibragimova, Junior Researcher, Laboratory of Viral Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: imk1805@yandex.ru. Researcher ID (WOS): C-8609-2012. Author ID (Scopus): 57130579200. ORCID: 0000-0001-8815-2786.

Elena E. Perminova, student, Siberian State Medical University (Tomsk, Russia). E-mail: elenape11@mail.ru.

Olga V. Cheremisina, MD, DSc, Head of the Department of Endoscopy, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: CheremisinaOV@oncology.tomsk.ru. Researcher ID (WOS): C-9259-2012. Author ID (Scopus): 6602197938. ORCID: 0000-0001-7234-4708.

Irina G. Frolova, MD, DSc, Professor, Head of the Diagnostic Imaging Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: frolovaIG@oncology.tomsk.ru. Researcher ID (WOS): C-8212-2012. Author ID (Scopus): 7006413170. ORCID: 0000-0001-5227-006X.

Sergey A. Tuzikov, MD, DSc, Professor, Head of the Thoracic Surgery Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: tuzikovSA@oncology.tomsk.ru. Researcher ID (WOS): D-1176-2012. Author ID (Scopus): 6507842873. ORCID: 0000-0002-0884-1838.

Nikolay V. Litviakov, DSc, Head of the Laboratory of Viral Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: nvlitv72@yandex.ru. Researcher ID (WOS): C-3263-2012. Author ID (Scopus): 6506850698. ORCID: 0000-0002-0714-8927.

Funding

The research was carried out with the support of the program «Participants of the Youth Scientific and Innovation Contest (UMNIK) of the Foundation for the Promotion of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Sphere. Agreement (Agreement) No. 11783 GU / 2017 of July 3, 2017. Theme: «Development of a method for predicting the efficacy of postoperative chemotherapy in patients with lung cancer».

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Для цитирования: Бывальцев В.А., Степанов И.А. Особенности и факторы риска рецидивирования интрадуральных опухолей спинного мозга. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 21–29. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-21-29.

For citation: Byvaltsev V.A., Stepanov I.A. Features and risk factors for recurrence of intradural spinal tumors. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 21–29. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-21-29.

ОСОБЕННОСТИ И ФАКТОРЫ РИСКА РЕЦИДИВИРОВАНИЯ ИНТРАДУРАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ СПИННОГО МОЗГА

В.А. Бывальцев^{1,2,3,4}, И.А. Степанов¹

ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет», г. Иркутск, Россия¹

Россия, г. Иркутск, 664003, ул. Красного Восстания, 1. E-mail: vadimabyvaltsev@gmail.com¹

НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Иркутск-Пассажирский», г. Иркутск, Россия²

Россия, г. Иркутск, 664005, ул. Боткина, 10²

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», г. Иркутск, Россия³

Россия, г. Иркутск, 664003, ул. Борцов Революции, 1³

ФГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования»,
г. Иркутск, Россия⁴

Россия, г. Иркутск, 664079, Юбилейный мкр., 100⁴

Аннотация

Опухоли спинного мозга включают в себя несколько нозологических единиц и классифицируются в зависимости от их локализации и гистологического типа. Поиск литературных источников в базах данных Pubmed, EMBASE и eLibrary продемонстрировал отсутствие исследований, посвященных изучению особенностей и факторов риска рецидивирования интрадуральных опухолей спинного мозга. **Цель исследования** – выявить особенности и факторы риска рецидивирования интрадуральных опухолей спинного мозга после выполнения микронейрохирургической резекции. **Материал и методы.** В исследование включены медицинские карты 196 пациентов с интрадуральными экстрамедуллярными и интрамедуллярными опухолями спинного мозга. Проанализированы объем микронейрохирургической резекции опухолевой ткани, клиническая эффективность выполненных оперативных вмешательств, факторы риска и особенности рецидивирования интрадуральных спинальных неоплазий. **Результаты.** Снижение степени неврологического дефицита после оперативного вмешательства отмечено в 116 (59,1 %) случаях, у 47 (24,0 %) пациентов неврологический статус остался прежним и у 33 (16,8 %) больных отмечено ухудшение степени неврологического дефицита. Тотальная микронейрохирургическая резекция интрадуральных опухолей спинного мозга достигнута у 140 (71,4 %) пациентов, субтотальная резекция – у 22 (11,2 %) случаях, частичная резекция – у 25 (12,7 %) пациентов, и биопсия или декомпрессия спинного мозга и/или его корешков выполнена 9 (4,6 %) больным. Вероятность безрецидивной выживаемости пациентов с доброкачественными интрадуральными опухолями спинного мозга значительно превышала такой показатель у больных со злокачественными новообразованиями ($p < 0,001$). Доброкачественные опухоли ($\chi^2 = 34,7$, $p < 0,05$), неоплазии грудной и пояснично-крестцовой локализации ($\chi^2 = 10,3$, $p < 0,05$), низкая степень неврологического дефицита ($\chi^2 = 31,5$, $p < 0,05$), отсутствие признаков сирингомиелии/сирингобульбии ($\chi^2 = 13,2$, $p < 0,05$), а также экстрамедуллярная локализация ($\chi^2 = 12,6$, $p < 0,05$) значительно позволяют достигнуть тотальной микронейрохирургической резекции. Злокачественные опухоли ($\chi^2 = 34,8$, $p < 0,05$), шейная и грудная локализация ($\chi^2 = 8,4$, $p < 0,05$), высокая степень неврологического дефицита ($\chi^2 = 12,9$, $p < 0,05$), выполнение частичной резекции, биопсии или декомпрессии невралгических структур ($\chi^2 = 9,7$, $p < 0,05$), интрамедуллярная локализация опухолей значительно повышают риск рецидива. **Заключение.** Гистологические особенности, локализация, степень предоперационного клиничко-неврологического дефицита по шкале McCormick и объем оперативного вмешательства являются достоверными факторами риска рецидивирования интрадуральных опухолей спинного мозга.

Ключевые слова: интрадуральные опухоли спинного мозга, микронейрохирургическая резекция, рецидивирование, факторы риска, клиничко-морфологические особенности.

FEATURES AND RISK FACTORS FOR RECURRENCE OF INTRADURAL SPINAL TUMORS

V.A. Byvaltsev^{1,2,3,4}, I.A. Stepanov¹

Irkutsk State Medical University, Ministry of Health, Irkutsk, Russia¹

1, Krasnogo Vosstaniya Street, Irkutsk-664003, Russia. E-mail: byval75vadim@yandex.ru¹

Railway Clinical Hospital on the station Irkutsk-Passazhirskiy, Irkutsk, Russia²

10, Railways Ltd., Botkina Street, Irkutsk-664082, Russia²

Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia³

1, Bortsov Revolutsii Street, Irkutsk-664003, Russia³

Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education microdistrict, Irkutsk, Russia⁴

100, Yubileiniy, Irkutsk-664049, Russia⁴

Abstract

Spinal cord tumors include a variety of nosological units and are classified according to their localization and histological type. The search for literature sources in the Pubmed, EMBASE and eLibrary databases demonstrated the absence of studies devoted to study of the features and risk factors for the recurrence of intradural spinal tumors. **The purpose of this study** was to reveal features and risk factors of recurrence of intradural spinal tumors after microneurosurgical resection. **Material and Methods.** The study included medical records of 196 patients with intradural extramedullary and intramedullary spinal tumors. The extent of microneurosurgical tumor resection, clinical efficacy of surgery, and risk factors for recurrence of intradural spinal cord tumors were been analyzed. **Results.** Improvement in neurologic deficit after surgery was noted in 116 (59.1 %) cases, neurologic status remained the same in 47 (24.0 %) patients, and worsening of neurological deficit was observed in 33 (16.8 %) cases. Total microneurosurgical resection of intradural spinal tumors was performed in 140 (71.4 %) patients, subtotal resection in 22 (11.2 %) patients, partial resection in 25 (12.7 %) patients and spinal cord decompression or biopsy and/or its roots were performed in 9 (4.6 %) of patients. The likelihood of recurrence-free survival of patients with benign intradural spinal cord tumors was significantly higher than that of patients with malignant tumors ($p < 0.001$). Benign tumors ($\chi^2 = 34.7$, $p < 0.05$), thoracic and lumbosacral tumors ($\chi^2 = 10.3$, $p < 0.05$), low degree of neurological deficit ($\chi^2 = 31.5$, $p < 0.05$), absence of syringomyelia/syringobulbia signs ($\chi^2 = 13.2$, $p < 0.05$), as well as extramedullary tumors ($\chi^2 = 12.6$, $p < 0.05$) allowed us to perform total degree microneurosurgical resection. Malignant tumors ($\chi^2 = 34.8$, $p < 0.05$), cervical and thoracic tumors ($\chi^2 = 8.4$, $p < 0.05$), high degree of neurological deficit ($\chi^2 = 12.9$, $p < 0.05$), partial resection, biopsy or decompression of neural structures ($\chi^2 = 9.7$, $p < 0.05$) and intramedullary tumors statistically significantly increased the risk of their recurrence. **Conclusion.** Histological pattern, tumor localization, preoperative clinical and neurological deficit according to the McCormick classification and the extent of surgery are significant risk factors for recurrence of intradural spinal tumors.

Key words: intradural spinal tumors, microneurosurgical resection, recurrence, risk factors, clinical and morphological features.

Введение

Опухоли спинного мозга (ОСМ) включают в себя ряд нозологических единиц и классифицируются в зависимости от их локализации и гистологического типа [1, 2]. Учитывая топографо-анатомические особенности ОСМ, их тотальное удаление в большинстве случаев ассоциировано с высоким риском нежелательных явлений [3], в связи с чем основным методом хирургического лечения ряда опухолей спинного мозга является субтотальная резекция с целью сохранения и/или улучшения качества жизни пациентов [4]. Однако в большинстве случаев субтотальная резекция некоторых гистологических типов ОСМ приводит к рецидиву, что значительно снижает эффективность хирургического лечения и качество жизни пациентов [5, 6]. За последние два десятилетия с развитием микронеурохирургической техники,

современных методов интраоперационной нейровизуализации и нейронавигации эффективность хирургического лечения опухолей спинного мозга значительно возросла [7]. Благодаря разработке различных минимально-инвазивных методик, оперативных доступов, способов микронеурохирургической резекции и нейрофизиологического контроля снизились продолжительность подобных оперативных вмешательств, объем кровопотери, а также частота рецидивов и уровень смертности в данной группе больных [8, 9]. Тем не менее поиск литературных источников в базах данных Pubmed, EMBASE и eLibrary продемонстрировал отсутствие исследований, посвященных изучению особенностей и факторов риска рецидивирования интрадуральных опухолей спинного мозга.

Цель исследования – выявить особенности и факторы риска рецидивирования интрадураль-

ных опухолей спинного мозга после выполнения микронейрохирургической резекции.

Материал и методы

Выполнено открытое наблюдательное неконтролируемое нерандомизированное моноцентровое ретроспективное исследование. Предметом изучения являлась медицинская документация пациентов, прооперированных по поводу интрадуральных опухолей спинного мозга (экстра- и интрамедуллярных) в период с июля 2009 г. по август 2018 г. Исследование выполнено на базе Центра нейрохирургии НУЗ «Дорожная клиническая больница на станции Иркутск-Пассажирский» ОАО «РЖД-Медицина» (г. Иркутск, Россия).

Критерии включения в исследование: наличие интрадуральных опухолей спинного мозга; патоморфологическое подтверждение диагноза; статус пациента по индексу Карновского не менее 70 %; добровольное информированное согласие на включение в исследование; выполнение оперативного вмешательства в соответствии со стандартным протоколом; отсутствие противопоказаний к проведению химиотерапии.

Критерии исключения: тяжелые нарушения проводимости и ритма сердца; тяжелое течение артериальной гипертензии; декомпенсированный сахарный диабет; тяжелая сердечная и/или дыхательная недостаточность; тяжелая почечная и/или печеночная недостаточность; множественное метастатическое поражение; беременность; лактация.

Всем пациентам в предоперационном периоде выполнены комплексное клиничко-неврологическое обследование, а также МРТ спинного мозга на уровне поражения с внутривенным контрастированием в различных режимах с помощью аппарата Siemens Magnetom Essenza 1,5 Тл (Siemens, Германия) (рис. 1). Во всех случаях удаление опухолей проведено одной хирургической бригадой при помощи микронейрохирургической техники (рис. 2), интраоперационного нейрофизиологического мониторинга ISIS IOM (Inomed, Германия) и под увеличением операционного микроскопа OPMI Pentero 900 (Carl Zeiss, Германия). Для оценки сте-

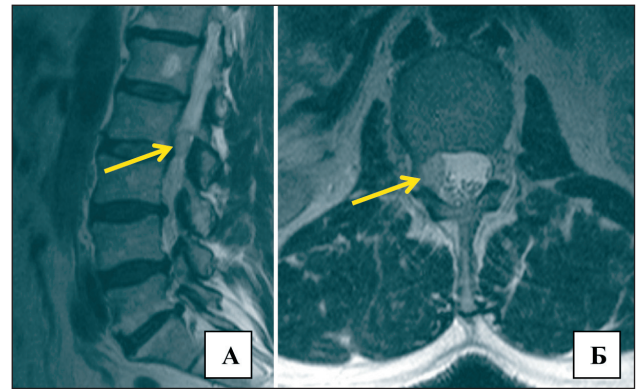


Рис. 1. Интрадуральная экстремедуллярная опухоль спинного мозга (шваннома). МРТ позвоночника: А – Т2-ВИ, сагиттальный срез; Б – Т2-ВИ, аксиальный срез

пени резекции опухолей использованы критерии Vogelbaum et al. [10], согласно которым удаление более 90–98 % опухолевой ткани соответствует максимальной или тотальной резекции, менее 90 % – субтотальной резекции. Степень резекции опухолевой ткани оценивалась при сравнении пред- и послеоперационных МРТ-изображений спинного мозга с внутривенным контрастированием, полученных через 48–72 ч после операции. Сравнение МРТ-изображений выполнялось двумя врачами-рентгенологами. При возникновении разногласий относительно объема резекции, итоговое решение принималось коллегиально всем авторским коллективом. При прогнозировании злокачественной природы опухоли и/или ее высокого пролиферативного потенциала по данным диффузионно-взвешенной МРТ [11] использована флуоресцентная навигация с препаратом 5-аминолевулиновой кислоты Аласенс (НИОПИК, Россия) в режиме визуализации Blue-400 согласно современным клиническим рекомендациям [12]. Удаленные объемные образования подвергались гистологическому исследованию (рис. 3, 4). Адьювантная химиолучевая терапия злокачественных интрадуральных ОСМ проводилась в соответствии с клиническими рекомендациями Ассоциации нейрохирургов России от 2013 г.

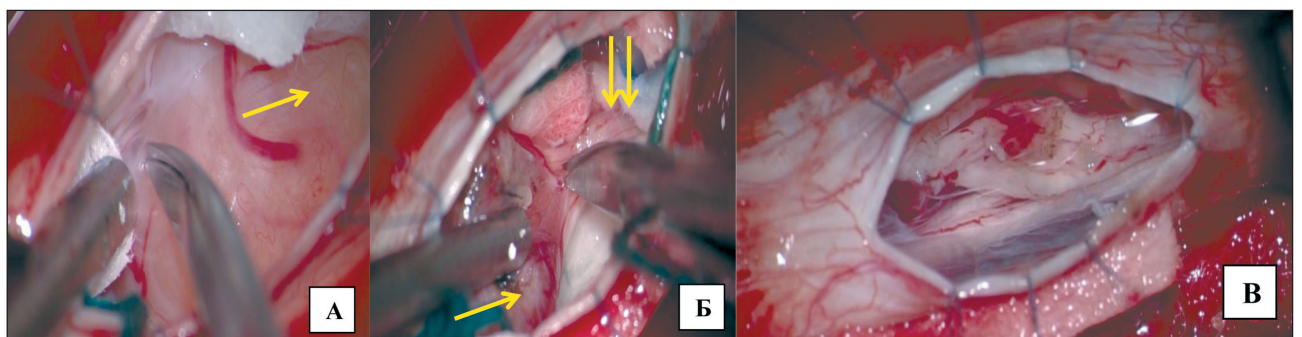


Рис. 2. Этапы тотальной микронейрохирургической резекции интрадуральной экстремедуллярной опухоли спинного мозга (шваннома): А – острая арахноидальная диссекция; Б – отделение острым путем опухоли от корешка спинного мозга; В – ложе опухоли после тотального удаления. Опухоль указана одной стрелкой, корешок спинного мозга – двумя стрелками

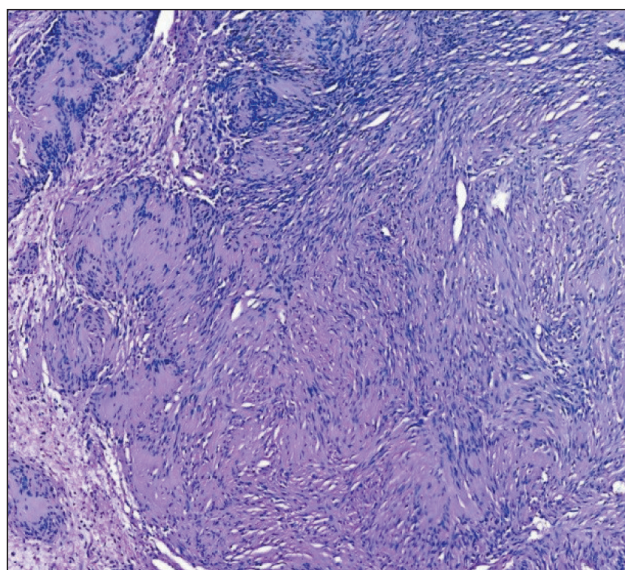


Рис. 3. Микрофото. Шваннома эпителиоидного типа. Световая микроскопия, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

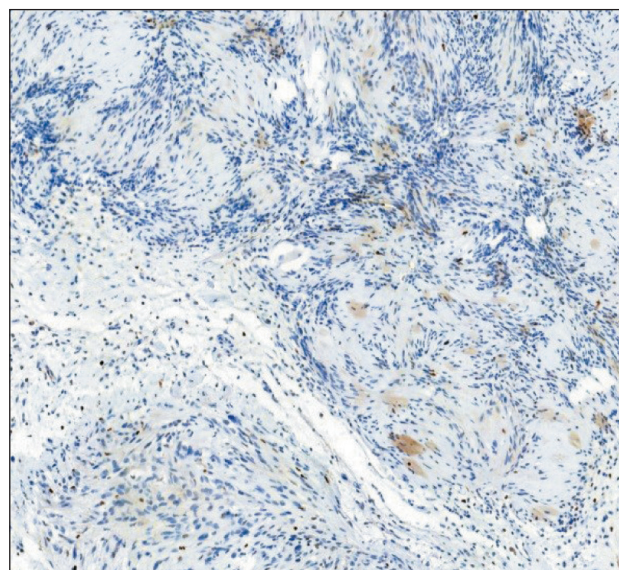


Рис. 4. Микрофото. Шваннома эпителиоидного типа. Иммуногистохимическое исследование, окраска моноклональными антителами MIB-1, индекс пролиферативной активности Ki67 – 3 %, $\times 100$

Определены локализация и гистологические варианты интрадуральных опухолей спинного мозга, а также объем микронейрохирургической резекции опухолевой ткани и клиническая эффективность выполненных операций. Также изучены возраст, пол пациентов, факторы риска и особенности рецидивирования интрадуральных спинальных неоплазий. До- и послеоперационный клико-неврологический статус пациентов оценивался с помощью модифицированной шкалы McCormick. Локализация и подтверждение рецидива интрадуральных опухолей спинного мозга верифицировались с помощью сагиттальных МРТ-изображений и подтверждались интраоперационно. Патоморфологическая характеристика опухолей определялась в соответствии с международной гистологической классификацией опухолей центральной нервной системы (ВОЗ, 2016 г.) [13].

Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 7/1 от 10.02.17). Исследование проводилось в соответствии с принципами надлежащей клинической практики и Хельсинкской декларации [14].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010. Полученные данные представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений. Межгрупповое сравнение данных выполнено с помощью t-теста Стьюдента. При сравнении значений, распределение которых отличалось от нормального, применялся U-тест Манна – Уитни. Категориальные переменные выражались в процентах, а их межгрупповое сравнение прово-

Таблица 1

Локализация и патоморфологическая характеристика интрадуральных опухолей спинного мозга

Локализация опухолей	Количество пациентов (n=196)
Шейный отдел	68 (34,7 %)
Грудной отдел	31 (15,8 %)
Поясничный отдел	97 (49,5 %)
Патоморфологическая характеристика опухолей	
Шванномы	53 (27,0 %)
Менингиомы	7 (3,5 %)
GI	4 (2,0 %)
GII	2 (1,0 %)
GIII	1 (0,5 %)
Эпендимомы	46 (23,4 %)
GI	42 (21,4 %)
GII	3 (1,5 %)
GIII	1 (0,5 %)
Интрадуральные метастазы	6 (3,0 %)
Астроцитарные опухоли	36 (18,3 %)
GI	18 (9,1 %)
GII	12 (6,1 %)
GIII	5 (2,5 %)
GIV	1 (0,5 %)
Гемангиобластомы	19 (9,7 %)
Дермоидные кисты	7 (3,57 %)
Нейрофибромы	3 (1,5 %)
Гемангиома	8 (4,0 %)
Липома	5 (2,5 %)
Гамартома	6 (3,0 %)

дилось с помощью критерия χ^2 . Кривые Каплана – Мейера применяли для оценки безрецидивной выживаемости [15]. Вероятность безрецидивной выживаемости представлена в виде медианы и 95 % доверительного интервала (95 % ДИ). Сравнение кривых безрецидивной выживаемости выполнено с помощью логарифмического рангового критерия Манталя–Кокса [16]. Влияние различных факторов на риск рецидива интрадуральных опухолей оценивалось методом множественного логистического регрессионного анализа. Порог значимости p равен 0,05.

Результаты

В исследование включены медицинские карты 196 пациентов с интрадуральными экстрамедуллярными и интрамедуллярными опухолями спинного мозга. Из них – 85 женщин и 111 мужчин, возраст которых варьировал от 31 до 75 лет (средний возраст – $54,8 \pm 12,7$ года).

Локализация и патоморфологическая характеристика интрадуральных опухолей спинного мозга представлены в табл. 1. Согласно международной гистологической классификации опухолей центральной нервной системы (ВОЗ, 2016 г.) к

злокачественным интрадуральным неоплазиям отнесены следующие ОСМ: анапластические менингиомы (GIII), эпендимомы (GII–III), интрадуральные метастазы, диффузные астроцитомы (GII) и астроцитарные опухоли высокой степени злокачественности (GIII–IV). Доброкачественные интрадуральные опухоли спинного мозга верифицированы у 167 (85,2 %), злокачественные – у 29 (14,8 %) пациентов. Снижение степени неврологического дефицита после выполнения оперативного вмешательства отмечено в 116 (59,1 %) случаях, у 47 (24,0 %) пациентов неврологический статус остался прежним, у 33 (16,8 %) больных отмечено ухудшение степени неврологического дефицита по модифицированной шкале McCormick. Среди основных послеоперационных клинико-неврологических симптомов необходимо отметить нарушение чувствительности, выраженный болевой синдром в области оперативного вмешательства, атаксию и нарушение функций органов малого таза (табл. 2).

Тотальная микронейрохирургическая резекция интрадуральных опухолей спинного мозга достигнута у 140 (71,4 %) пациентов, субтотальная резекция – у 22 (11,2 %), частичная резекция –

Таблица 2

Характеристика послеоперационного клинико-неврологического статуса пациентов

Локализация опухолей	Нарушения чувствительности	Выраженный болевой синдром	Атаксия	Нарушение функций органов малого таза	Двигательные нарушения
Шейный отдел	18 (9,1 %)	13 (6,6 %)	9 (4,6 %)	3 (1,5 %)	8 (4,0 %)
Грудной отдел	13 (6,6 %)	10 (5,1 %)	6 (3,0 %)	-	4 (2,0 %)
Поясничный отдел	15 (7,6 %)	11 (5,6 %)	8 (4,0 %)	5 (2,5 %)	13 (6,6 %)
Всего	46 (23,3 %)	34 (17,3 %)	23 (11,6 %)	8 (4,0 %)	25 (12,6 %)

Таблица 3

Зависимость объема оперативного вмешательства от гистотипа интрадуральных опухолей спинного мозга

Гистотип опухолей	Объем оперативного вмешательства			Биопсия / Декомпрессия
	Тотальная резекция	Субтотальная резекция	Частичная резекция	
Шванномы	52 (98,2 %)	1 (1,8 %)	-	-
Менингиомы	6 (85,7 %)	1 (14,3 %)	-	-
Эпендимомы	41 (89,1 %)	2 (4,4 %)	2 (4,4 %)	1 (2,1 %)
Интрадуральные метастазы	2 (33,3 %)	2 (33,3 %)	1 (16,7 %)	1 (16,7 %)
Астроцитомы	7 (19,4 %)	9 (25,0 %)	16 (44,4 %)	4 (11,2 %)
Гемангиобластомы	18 (94,7 %)	1 (5,3 %)	-	-
Дермоидные кисты	4 (57,1 %)	1 (14,3 %)	1 (14,3 %)	1 (14,3 %)
Нейрофибромы	2 (66,7 %)	1 (33,3 %)	-	-
Гемангиома	7 (87,5 %)	1 (12,5 %)	-	-
Липома	-	1 (20,0 %)	2 (40,0 %)	2 (40,0 %)
Гамартома	1 (16,7 %)	2 (33,3 %)	3 (50,0 %)	-
Всего	140 (71,4 %)	22 (11,2 %)	25 (12,7 %)	9 (4,6 %)

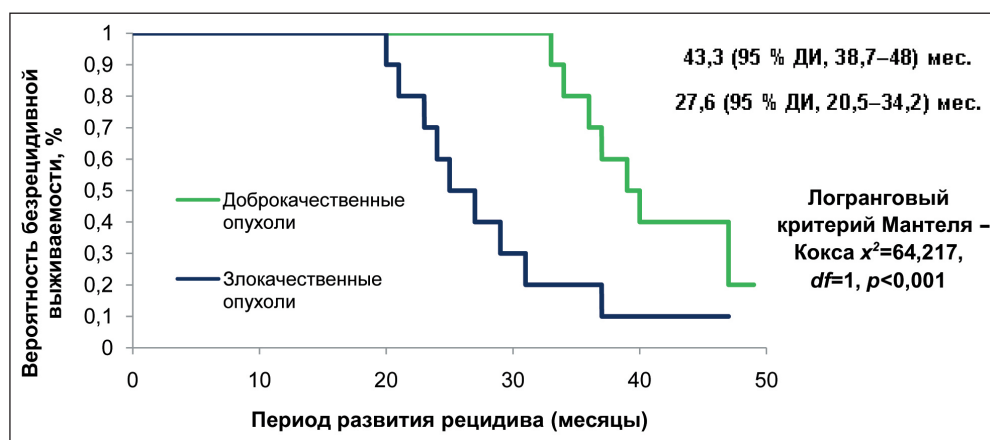


Рис. 5. Показатели безрецидивной выживаемости по методу Каплана – Мейера у пациентов с доброкачественными и злокачественными интрадуральными опухолями спинного мозга

у 25 (12,7 %) пациентов, биопсия или декомпрессия спинного мозга и/или его корешков выполнена у 9 (4,6 %) больных. Зависимость объема оперативного вмешательства от гистотипа интрадуральных ОСМ представлена в табл. 3.

Рецидив интрадуральных опухолей спинного мозга в различные периоды послеоперационного наблюдения отмечен у 85 (43,3 %) пациентов. При этом рецидивы доброкачественных интрадуральных неоплазий спинного мозга возникли в 73 (43,7 %) случаях, злокачественных – в 12 (41,3 %) наблюдениях. Вероятность безрецидивной выживаемости пациентов с доброкачественными интрадуральными ОСМ (43,3 (95 % ДИ, 38,7–48) мес) значительно превышала аналогичный показатель при злокачественных новообразованиях (27,6 (95 % ДИ, 20,5–34,2) мес) ($p<0,001$) (рис. 5). Рецидивы опухолей спинного мозга верифицированы у 49 (25,0 %) мужчин и у 36 (18,3 %) женщин, при этом значимых различий в зависимости от пола не обнаружено ($p=0,246$). Среди больных с рецидивами интрадуральных неоплазий спинного мозга у 31 (36,4 %) наблюдался неврологический дефицит I–II степени по модифицированной шкале McCormick, III степени – у 47 (55,3 %), IV–V степени – у 7 (8,2 %) пациентов ($p<0,001$).

Необходимо отметить, что у пациентов, впервые оперированных по поводу интрадуральной опухоли спинного мозга и имеющих высокую степень (III–V степени) неврологического дефицита по шкале McCormick, значимо чаще наблюдались рецидивы ($p<0,001$). Рецидив интрадуральных новообразований спинного мозга отмечен у 19 (16,2 %) из 117 пациентов, которым была выполнена тотальная микронеурхирургическая резекция опухолевой ткани, и во всех случаях после субтотальной, частичной резекции или биопсии ОСМ. Рецидив спинальных опухолей интрадуральной локализации отмечен у 5 (5,88 %) пациентов в возрасте менее 40 лет, у 58 (68,2 %) – в возрасте 40–60 лет, у 22 (25,8 %) – старше 60 лет.

Анализ влияния различных факторов на выполнение тотальной микронеурхирургической резекции интрадуральных опухолей спинного мозга показал, что доброкачественные опухоли ($\chi^2=34,7$, $p<0,05$), неоплазии грудной и пояснично-крестцовой локализации ($\chi^2=10,3$, $p<0,05$), низкая степень неврологического дефицита по шкале McCormick ($\chi^2=31,5$, $p<0,05$), отсутствие признаков сирингомиелии/сирингобульбии ($\chi^2=13,2$, $p<0,05$), а также экстрамедуллярная локализация ($\chi^2=12,6$, $p<0,05$) значимо позволяют достигнуть тотальной микронеурхирургической резекции. При этом шейная локализация интрадуральных опухолей спинного мозга ($\chi^2=14,6$, $p=0,43$), злокачественные новообразования ($\chi^2=28,2$, $p=0,17$), наличие признаков сирингомиелии/сирингобульбии ($\chi^2=19,8$, $p=0,51$), высокая степень неврологического дефицита по шкале McCormick ($\chi^2=23,8$, $p=0,38$) и интрадуральная локализация опухолей не позволяют достигнуть тотальной микронеурхирургической резекции.

Множественный логистический регрессионный анализ продемонстрировал, что злокачественные новообразования ($\chi^2=34,8$, $p<0,05$), шейная и грудная локализация опухолей ($\chi^2=8,4$, $p<0,05$), высокая степень неврологического дефицита по модифицированной шкале McCormick ($\chi^2=12,9$, $p<0,05$), выполнение частичной резекции, биопсии опухолевой ткани или декомпрессии невралных структур ($\chi^2=9,7$, $p<0,05$) и интрамедуллярная локализация значимо повышают риск рецидива. С другой стороны, доброкачественные интрадуральные опухоли спинного мозга ($\chi^2=25,4$, $p=0,38$), пояснично-крестцовая локализация ($\chi^2=12,4$, $p=0,41$), низкая степень неврологического дефицита по модифицированной шкале McCormick ($\chi^2=32,6$, $p=0,66$), выполнение субтотальной и тотальной резекции ($\chi^2=28,5$, $p=0,19$) и экстрамедуллярная локализация объемных образований ($\chi^2=17,5$, $p=0,37$) не влияют на риск развития рецидива.

Обсуждение

По данным литературы, интрадуральные опухоли являются наиболее распространенной группой ОСМ. Так, интрадуральные экстрамедуллярные опухоли составляют 53–68,5 % всех опухолей спинного мозга. В свою очередь, частота интрадуральных интрамедуллярных опухолей спинного мозга варьирует от 10 до 18 % от общего числа ОСМ [17]. Для интрадуральных опухолей спинного мозга характерно большое количество гистологических вариантов и отсутствие клинико-неврологических проявлений на ранних стадиях заболевания. По этой причине у большей части пациентов с данной патологией оперативное вмешательство осуществляется на поздних стадиях заболевания, что напрямую влияет на эффективность хирургического лечения и прогноз [18]. С развитием современных методов нейровизуализации появилась возможность ранней диагностики новообразований ЦНС, в том числе и интрадуральных опухолей спинного мозга. Кроме того, стремительное развитие микронеурохирургии, роботизированной техники и внедрение новых биомедицинских материалов позволили значительно улучшить эффективность хирургического лечения пациентов со спинальными опухолями [19, 20].

Как известно, большая часть интрадуральных ОСМ относится к злокачественным новообразованиям. При этом подавляющее большинство клинических исследований направлено на изучение результатов оперативного лечения доброкачественных опухолей спинного мозга, что приводит к снижению хирургической активности в отношении злокачественных спинальных новообразований и расширению показаний к проведению лучевой терапии [21–23]. Микронеурохирургическое вмешательство является основной опцией при лечении опухолей спинного мозга. Вместе с тем хирургическое лечение данных неоплазий сопряжено с рядом нежелательных явлений, в том числе и с рецидивом опухолей [24].

В исследовании J. Klekamp [25] отмечено, что за последние 30 лет частота выполнения тотальной микронеурохирургической резекции ОСМ значительно увеличилась. Примерно у 61 % пациентов в послеоперационном периоде отмечены различные клинико-неврологические проявления, из которых 41,5 % являлись транзиторными. Частота стойкого неврологического дефицита составила 19,5 %, что, по мнению автора, связано с опытом нейрохирургов и предоперационным функциональным состоянием вещества спинного мозга и его корешков. Также автором исследования наглядно продемонстрировано, что пациенты с ОСМ грудной локализации, выраженным кровотечением из опухолевой ткани во время резекции, а также злокачественными новообразованиями и/или рецидивами значительно чаще имели стойкий послеоперационный неврологический дефицит.

Причины рецидивирования опухолей спинного мозга до конца не изучены. Доказано, что степень

злокачественности опухоли влияет на вероятность рецидива и выживаемость пациентов [26]. За исключением некоторых типов астроцитом рецидивы злокачественных опухолей спинного мозга встречаются практически в 100 % случаев. По этой причине лучевая терапия является основным методом лечения злокачественных ОСМ [27–29]. С другой стороны, для определенных типов инвазивных интрадуральных опухолей спинного мозга тотальная или субтотальная микронеурохирургическая резекция позволяют значительно снизить риск развития рецидива и тем самым улучшить результаты лечения. Влияние объема операции на вероятность рецидива эпидимом спинного мозга не доказано. В работе S. Nair et al. [30] показано, что между степенью резекции спинальных астроцитом и значением безрецидивной выживаемости отсутствует достоверная корреляционная зависимость. Полученные нами данные во многом согласуются с результатами указанного исследования.

Настоящее исследование имеет ряд ограничений, которые необходимо обозначить. Так, исследование имеет ретроспективный характер с включением незначительного количества респондентов, что не могло не отразиться на результатах статистического анализа полученных данных. У большей части пациентов, включенных в исследование, опухоли локализовались в поясничном отделе, что также могло повлиять на результаты статистической обработки данных. Стоит отметить, что нами не учитывались соматические факторы и применение интраоперационной флуоресцентной навигации с препаратом 5-аминолевулиновой кислоты и достоверность их влияния как на клинико-неврологические исходы хирургического лечения исследуемой группы пациентов, так и на вероятность рецидивирования интрадуральных опухолей спинного мозга. Безусловно, для более объективной оценки факторов риска и особенностей рецидивирования интрадуральных спинальных новообразований необходимо проведение дальнейших крупных мультицентровых исследований на большем количестве пациентов.

Заключение

Полученные данные позволяют утверждать, что гистологические особенности, локализация, степень предоперационного клинико-неврологического дефицита по шкале McCormick и объем выполненного оперативного вмешательства являются значимыми факторами риска рецидивирования интрадуральных опухолей спинного мозга. Клиническая оценка указанных факторов может иметь важное значение при выборе наиболее рациональной тактики лечения пациентов с интрадуральными спинальными новообразованиями. Необходима дальнейшая разработка и совершенствование микронеурохирургических методов лечения опухолей спинного мозга.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bhat A.R., Kirmani A.R., Wani M.A., Bhat M.H. Incidence, histopathology, and surgical outcome of tumors of spinal cord, nerve roots, meninges, and vertebral column – Data based on single institutional (Sher-i-Kashmir Institute of Medical Sciences) experience. *J Neurosci Rural Pract.* 2016; 7 (3): 381–391. doi: 10.4103/0976-3147.181489.
2. Бывальцев В.А., Степанов И.А., Белых Е.Г., Алиев М.А. Анализ отдаленных результатов хирургического лечения пациентов с интрадуральными опухолями спинного мозга. *Вестник РАМН.* 2018; 73: 88–95. [Byval'tsev V.A., Stepanov I.A., Belykh E.G., Aliyev M.A. Long-term Results of Surgical Treatment in Patients with Intradural Spinal Tumors. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2018; 73: 88–95. (in Russian)]. doi: 10.15690/vramn945.
3. Hirano K., Imagama S., Sato K., Kato F., Yukawa Y., Yoshihara H., Kamiya M., Deguchi M., Kanemura T., Matsubara Y., Inoh H., Kawakami N., Takatsu T., Ito Z., Wakao N., Ando K., Tauchi R., Muramoto A., Matsuyama Y., Ishiguro N. Primary spinal cord tumors: review of 678 surgically treated patients in Japan. A multicenter study. *Eur Spine J.* 2012 Oct; 21 (10): 2019–26. doi: 10.1007/s00586-012-2345-5.
4. Бывальцев В.А., Сороковиков В.А., Дамдинов Б.Б., Белых Е.Г., Середя Э.В., Панасенков С.Ю., Григорьев Е.Г. Факторы, влияющие на исход хирургического лечения экстрадуральных опухолей спинного мозга: мультицентровое исследование. Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. 2014; 6: 15–23. [Byval'tsev V.A., Sorokovikov V.A., Damdinov B.B., Belykh E.G., Sereda E.V., Panasenkov S.Yu., Grigor'ev E.G. Factors affecting the outcome of surgical management for extramedullary spinal cord tumors: a multicenter study. *Problems of Neurosurgery named after N.N. Burdenko.* 2014; 6: 15–23. (in Russian)]. doi: 10.17116/neiro201478615-23.
5. Samartzis D., Gillis C.C., Shih P., O'Toole J.E., Fessler R.G. Intramedullary Spinal Cord Tumors: Part I – Epidemiology, Pathophysiology, and Diagnosis. *Global Spine J.* 2015 Oct; 5 (5): 425–35. doi: 10.1055/s-0035-1549029.
6. Бывальцев В.А., Степанов И.А., Алиев М.А. Сравнение открытых и минимально-инвазивных методик в хирургическом лечении интрадуральных экстрадуральных опухолей спинного мозга у пациентов пожилого и старческого возраста. *Успехи геронтологии.* 2018; 3: 400–407. [Byval'tsev V.A., Stepanov I.A., Aliyev M.A. Comparison of open and minimally invasive techniques in the surgical treatment of intradural extramedullary spinal tumors in elderly and senile patients. *Successes of gerontology.* 2018; 3: 400–407. (in Russian)].
7. Uyas D., Cronin S. Peer Review and Surgical Innovation: Robotic Surgery and Its Hurdles. *Am J Robotic Surg.* 2015; 2 (1): 39–44. doi: 10.1166/ajrs.2015.1018.
8. Hariri O., Takayanagi A., Miulli D.E., Siddiqi J., Vrionis F. Minimally Invasive Surgical Techniques for Management of Painful Metastatic and Primary Spinal Tumors. *Cureus.* 2017; 9 (3): e1114. doi: 10.7759/cureus.1114.
9. Iacangelo M., Gladi M., Di Rienzo A., Dobran M., Alvaro L., Nocchi N., Maria L.G., Somma D., Colasanti R., Scerrati M. Minimally invasive surgery for benign intradural extramedullary spinal meningiomas: experience of a single institution in a cohort of elderly patients and review of the literature. *Clin Interv Aging.* 2012; 7: 557–564. doi:10.2147/CIA.S38923.
10. Vogelbaum M.A., Jost S., Aghi M.K., Heimberger A.B., Sampson J.H., Wen P.Y., Macdonald D.R., Van den Bent M.J., Chang S.M. Application of novel response/progression measures for surgically delivered therapies for gliomas; Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) working group. *Neurosurg.* 2012 Jan; 70 (1): 234–43. doi: 10.1227/NEU.0b013e318223f5a7.
11. Бывальцев В.А., Ступак В.В., Степанов И.А., Кичигин А.И. Применение коэффициента диффузии в предоперационной оценке пролиферативного потенциала опухолей позвоночного канала. *Хирургия позвоночника.* 2017; 3: 93–99. [Byval'tsev V.A., Stupak V.V., Stepanov I.A., Kichigin A.I. Application of the apparent diffusion coefficient in preoperative assessment of the proliferative potential of spinal tumors. *Spine Surgery.* 2017; 3: 93–99. (in Russian)]. doi: 10.14531/ss2017.3.93-99.
12. Потапов А.А., Горяйнов С.А., Охлопков В.А., Пицхелаури Д.И., Кобяков Г.Л., Жуков В.Ю., Гольбин Д.А., Севостов Д.В., Мартынов Б.В., Кривошапкин А.Л., Гайтан А.С., Анохина Ю.Е., Варюхина М.Д., Гольберг М.Ф., Кондрашов А.В., Чумакова А.П. Клинические рекомендации по использованию интраоперационной флуоресцентной диагностики в хирургии опухолей головного мозга. Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. 2015; 79 (5): 91. [Potapov A.A., Goryainov S.A., Okhlopov V.A., Pitskhelauri D.I., Kobayakov G.L., Zhukov V.Yu., Gol'bin D.A., Svistov D.V., Martynov B.V., Krivoshapkin A.L., Gaitan A.S., Anokhina Yu.E., Varyukhina M.D., Gol'dberg M.F., Kondrashov A.V., Chumakova A.P. Clinical guidelines for the use of intraoperative fluorescence diagnosis in brain tumor surgery. *Problems of Neurosurgery named after N.N. Burdenko.* 2015; 79 (5): 91. (in Russian)]. doi: 10.17116/neiro201579591-101.
13. Louis D.N., Perry A., Reifenberger G., von Deimling A., Figarella-Branger D., Cavenee W.K., Ohgaki H., Wiestler O.D., Kleihues P., Ellison D.W. The 2016 World Health Organization histological classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathologica.* 2016; 131 (6): 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
14. Williams J.R. The Declaration of Helsinki and public health. *Bulletin of the World Health Organization.* 2008; 86 (8): 650–652. doi: 10.2471/BLT.08.050955.
15. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958; 53: 457–481.
16. Royston P., Parmar M.K.B. Augmenting the logrank test in the design of clinical trials in which non-proportional hazards of the treatment effect may be anticipated. *BMC Med Res Methodol.* 2016 Feb 11; 16: 16. doi: 10.1186/s12874-016-0110-x.
17. Claus E.B., Abdel-Wahab M., Burger P.C., Engelhard H.H., Ellison D.W., Gaiano N., Gutmann D.H., Heck D.A., Holland E.C., Jallo G.I., Kruchko C., Kun L.E., Maria B.L., Rumboldt Z., Seminara D., Spinnella G.M., Stophel L., Wechsler-Reya R., Wensch M., Gilbertson R.J. Defining future directions in spinal cord tumor research: Proceedings from the National Institutes of Health workshop. *J Neurosurg Spine.* 2010 Feb; 12 (2): 117–21. doi: 10.3171/2009.7.SPINE09137.
18. Vera-Bolanos E., Aldape K., Yuan Y., Wu J., Wani K., Necesito-Reyes M.J., Colman H., Dhall G., Lieberman F.S., Mettel P., Mikkelsen T., Omuro A., Partap S., Prados M., Robins H.I., Soffietti R., Wu J., Gilbert M.R., Armstrong T.S.; CERN Foundation. Clinical course and progression-free survival of adult intracranial and spinal ependymoma patients. *Neuro Oncol.* 2015 Mar; 17 (3): 440–7. doi: 10.1093/neuonc/nou162.
19. Goldschlager T., Dea N., Boyd M., Reynolds J., Patel S., Rhines L.D., Mendel E., Pacheco M., Ramos E., Mattei T.A., Fisher C.G. Giant cell tumors of the spine: has denosumab changed the treatment paradigm? *J Neurosurg Spine.* 2015 May; 22 (5): 526–33. doi: 10.3171/2014.10.SPINE13937.
20. Zhang S., Yang L., Peng C., Wu M. Logistic regression analysis of risk factors for postoperative recurrence of spinal tumors and analysis of prognostic factors. *Oncol Lett.* 2018 Feb; 15 (2): 1716–1722. doi: 10.3892/ol.2017.7509.
21. Jahangiri A., Chin A.T., Wagner J.R., Kunwar S., Ames C., Chou D., Barani I., Parsa A.T., McDermott M.W., Benet A., El-Sayed I.H., Aghi M.K. Factors predicting recurrence after resection of clival chordoma using variable surgical approaches and radiation modalities. *Neurosurgery.* 2015; 76 (2): 179–185. doi: 10.1227/NEU.00000000000000611.
22. Xu W., Li X., Huang W., Wang Y., Han S., Chen S., Xu L., Yang X., Liu T., Xiao J. Factors affecting prognosis of patients with giant cell tumors of the mobile spine: retrospective analysis of 102 patients in a single center. *Ann Surg Oncol.* 2013 Mar; 20 (3): 804–10. doi: 10.1245/s10434-012-2707-6.
23. Fehlings M.G., Nater A., Zamorano J.J., Tetreault L.A., Varga P.P., Gokaslan Z.L., Boriani S., Fisher C.G., Rhines L., Betgeowda C., Kawahara N., Chou D. Risk Factors for Recurrence of Surgically Treated Conventional Spinal Schwannomas: Analysis of 169 Patients from a Multicenter International Database. *Spine (Phila Pa 1976).* 2016 Mar; 41 (5): 390–8. doi: 10.1097/BRS.0000000000001232.
24. Ahmed R., Menezes A.H., Awe O.O., Torner J.C. Long-term disease and neurological outcomes in patients with pediatric intramedullary spinal cord tumors. *J Neurosurg Pediatr.* 2014 Jun; 13 (6): 600–12. doi: 10.3171/2014.1.PEDS13316.
25. Klekamp J. Treatment of intramedullary tumors: analysis of surgical morbidity and long-term results. *J Neurosurg: Spine.* 2013; 19 (1): 12–26. doi: 10.3171/2013.3.SPINE121063.
26. Verma N., Cowperthwaite M.C., Burnett M.G., Markey M.K. Differentiating tumor recurrence from treatment necrosis: a review of neuro-oncologic imaging strategies. *Neuro Oncol.* 2013 May; 15 (5): 515–34. doi: 10.1093/neuonc/nos307.
27. Sohn S., Kim J., Chung C.K., Lee N.R., Sohn M.J., Kim S.H. A Nation-Wide Epidemiological Study of Newly Diagnosed Primary Spine Tumor in the Adult Korean Population, 2009–2011. *J Korean Neurosurg Soc.* 2017 Mar; 60 (2): 195–204. doi: 10.3340/jkns.2016.0505.011.
28. Lee C.S., Jung C.H. Metastatic Spinal Tumor. *Asian Spine J.* 2012 Mar; 6 (1): 71–87. doi: 10.4184/asj.2012.6.1.71.
29. Ciftidemir M., Kaya M., Selcuk E., Yalniz E. Tumors of the spine. *World J Orthop.* 2016 Feb 18; 7 (2): 109–16. doi: 10.5312/wjo.v7.i2.109.
30. Nair S., Gobin Y.P., Leng L.Z., Marcus J.D., Bilsky M., Laufer I., Patsalides A. Preoperative Embolization of Hypervascular Thoracic, Lumbar, and Sacral Spinal Column Tumors: Technique and Outcomes from a Single Center. *Interv Neuroradiol.* 2013; 19 (3): 377–85. doi: 10.1177/159101991301900317.

Поступила/Received 18.09.18
Принята в печать/Accepted 13.12.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бывальцев Вадим Анатольевич, доктор медицинских наук, главный нейрохирург Дирекции здравоохранения ОАО «РЖД»; руководитель Центра нейрохирургии Дорожной клинической больницы на ст. Иркутск-Пассажирский ОАО «РЖД-Медицина»; заведующий кафедрой нейрохирургии и инновационной медицины, Иркутский государственный медицинский университет; заведующий научно-клиническим отделом нейрохирургии, Иркутский научный центр хирургии и травматологии; профессор кафедры травматологии, ортопедии и нейрохирургии, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования; ведущий научный сотрудник, Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера (г. Иркутск, Россия). E-mail: vadimabyvaltsev@gmail.com. SPIN-код: 5996-6477. ORCID: 0000-0003-4349-7101.

Степанов Иван Андреевич, аспирант кафедры нейрохирургии и инновационной медицины, Иркутский государственный медицинский университет (г. Иркутск, Россия). E-mail: edmoilers@mail.ru. SPIN-код: 5485-5316. ORCID: 0000-0001-9039-9147.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Vadim A. Byvaltsev, MD, DSc, Head of Neurosurgery Department, Irkutsk State Medical University; Head of Neurosurgery Center of Road Clinical Hospital, Head of Neurosurgery Department of Irkutsk Surgery and Traumatology Center; Professor of the Department of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery of Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education (Irkutsk, Russia). E-mail: vadimabyvaltsev@gmail.com. ORCID: 0000-0003-4349-7101.

Ivan A. Stepanov, Postgraduate, Neurosurgery Department, Irkutsk State Medical University (Irkutsk, Russia). E-mail: edmoilers@mail.ru.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Для цитирования: *Расулов Р.И., Юдин А.А., Сонголов Г.И.* Метастатическое поражение печени при колоректальном раке у ранее радикально леченных больных. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 30–35. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-30-35.

For citation: *Rasulov R.I., Yudin A.A., Songolov G.I.* Liver metastases in patients with curatively treated colorectal cancer. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 30–35. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-30-35.

МЕТАСТАТИЧЕСКОЕ ПОРАЖЕНИЕ ПЕЧЕНИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ У РАНЕЕ РАДИКАЛЬНО ЛЕЧЕННЫХ БОЛЬНЫХ

Р.И. Расулов¹, А.А. Юдин², Г.И. Сонголов²

ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»
Минздрава РФ, г. Иркутск, Россия¹

Россия, г. Иркутск, 664049, м/р Юбилейный, 100. E-mail: gava2010@yandex.ru¹

ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Иркутск, Россия²

Россия, г. Иркутск, 664003, ул. Красного Восстания, 3. E-mail: inside-your-mind@yandex.ru²

Аннотация

Введение. Проблема метастатического поражения печени у ранее радикально леченных больных колоректальным раком остается малоизученной. Выявление значимых факторов, влияющих на возникновение метакронного метастазирования, способствует более точному прогнозированию развития рецидива у данного контингента больных. **Материал и методы.** В исследовании, включившем истории болезней 116 пациентов с колоректальным раком, ранее радикально леченных на базе Иркутского областного онкологического диспансера в период с 2006 по 2017 г., изучена частота и сроки развития метастазов печени, определены факторы прогноза их появления. Пациенты получали комбинированное лечение, включающее неоадьювантную лучевую или химиолучевую терапию, при локализованном и местнораспространенном раке прямой кишки, радикальную хирургическую операцию и адьювантную химиотерапию по показаниям – при раке ободочной и прямой кишки. После радикального лечения у пациентов первой группы (n=96) не возникло рецидива заболевания в виде отдаленных метастазов в печени. Во второй группе больных (n=20) имел место рецидив колоректального рака с развитием метастатического поражения печени и других органов. **Результаты.** Частота метастазов в печени составила 17 %. Пик развития метастазов в печени после завершения лечения приходится на 12–18-й мес. У большинства пациентов метастазы возникают через 16,5 мес с момента завершения радикального лечения (23 и 13 – верхний и нижний квартили). Прогностически значимыми факторами развития метастазов в печени у радикально леченных больных колоректальным раком являются: стадия опухолевого процесса, инвазия опухоли роста в пара- и мезоколярную, параректальную клетчатку, отсутствие предоперационной химиолучевой терапии и адьювантной химиотерапии. **Заключение.** С учетом факторов прогноза определены диагностические мероприятия раннего выявления метастатического поражения печени. В группе риска в послеоперационном периоде один раз в 3 мес необходимо исследовать раковый эмбриональный антиген (СЕА), выполнять мультиспиральную компьютерную томографию органов брюшной полости с внутривенным усилением, биопсию подозрительного (в отношении метастатического характера) очага печени под навигацией.

Ключевые слова: колоректальный рак, метастазирование, рецидив, раковый эмбриональный антиген, прогноз.

LIVER METASTASES IN PATIENTS WITH CURATIVELY TREATED COLORECTAL CANCER

R.I. Rasulov¹, A.A. Yudin², G.I. Songolov²

Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Irkutsk, Russia¹

100, Yubileyniy m/r., 664049-Irkutsk, Russia. E-mail: gava2010@yandex.ru¹

Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia²

3, Krasnogo vosstaniya Street, 664003-Irkutsk, Russia. E-mail: inside-your-mind@yandex.ru²

Abstract

Background. The problem of the development of liver metastases in colorectal cancer patients previously treated with curative intent surgery remains little studied. Identification of significant factors affecting the occurrence of metachronous metastasis contributes to a more accurate prediction of recurrence in this group of patients. **Material and Methods.** In our study we analyzed the incidence of liver metastases and prognostic factors in 116 colorectal cancer patients previously treated with curative intent at Irkutsk Regional Cancer Center between 2006 and 2017. The patients received combined modality treatment including neoadjuvant radiotherapy or chemoradiotherapy for localized and locally advanced rectal cancer, radical surgery and adjuvant chemotherapy. After curative treatment, 96 patients had no evidence of distant liver metastases, and 20 patients developed distant metastases. **Results.** The incidence of liver metastases was 17 %. In most patients, metastases occurred 16.5 months after completion of curative treatment, reaching peak incidence at 12–18 months. Prognostic factors of colorectal liver metastases in colorectal cancer patients previously treated with curative intent surgery were: the stage of the tumor, tumor growth in the parirectal/mesocolic fatty tissue, and no previous preoperative chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy. **Conclusion.** For early detection of liver metastases, the carcinoembryonic antigen (CEA) measurements, contrast-enhanced abdominal multislice CT, and ultrasound-guided liver biopsy were recommended to perform every 3 months in the postoperative period.

Key words: colorectal cancer, metastasis, recurrence, carcinoembryonic antigen, prognostic factors.

Введение

В 2016 г. в мире было зарегистрировано 1,4 млн новых случаев заболевания колоректальным раком (КРР) [1, 2]. Из них 75,1 % – больные с локализованными и местнораспространенными формами опухоли, у которых на этапе первичного установления диагноза отсутствуют отдаленные метастазы [1, 3]. Данным пациентам показано комбинированное лечение, включающее неоадъювантную лучевую или химиолучевую терапию при локализованных (по показаниям) и местнораспространенных вариантах рака прямой кишки, адъювантную терапию при местнораспространенных опухолях как прямой, так и ободочной кишки, после выполнения радикальной операции [3–7]. У 5 % радикально пролеченных больных спустя 6 мес, у 13 % – через 1 год и у 30 % – через 3 года возникают отдаленные метастазы в печени, легких и других органах [8–11]. В 98 % наблюдений при индексе pT3–4 в течение 3 лет развиваются метастазы печени [8–10]. Раннее выявление и лечение метастазов в печени в среднем позволяют добиться трёхлетней выживаемости [8–10].

В возникновении рецидива заболевания играет роль множество факторов, оказывая воздействие на которые до, во время и после радикального лечения, можно добиться предотвращения прогресси-

рования опухолевого процесса [9, 11]. Выявление значимых факторов, влияющих на возникновение метастазирования в печень, является основным способом прогнозирования развития рецидива у ранее радикально леченных больных колоректальным раком.

Цель исследования – изучить частоту и сроки развития метастазов в печени у ранее радикально леченных больных колоректальным раком в Иркутской области; определить факторы прогноза развития метастазов в печени; с учетом факторов прогноза обозначить группу риска по развитию метастазов в печени; определить диагностические мероприятия раннего выявления метастазов в печени.

Материал и методы

В период с 2006 по 2017 г. в Иркутском областном онкологическом диспансере проходили стационарное лечение 11 461 пациент с колоректальным раком. Из них, согласно критериям включения (первичные пациенты с КРР без отдаленных метастазов) и исключения (первичные пациенты, поступившие с отдаленными метастазами в печень, легкие, головной мозг и т. д.), мы сузили генеральную совокупность до 7 648 больных. Для определения необходимого объема выборки, извлекаемой из генеральной совокупности, ис-

пользовали формулу со следующими критериями: 1) требуемый доверительный уровень 95 %; 2) приемлемая ошибка выборочного исследования 5 %; 3) стандартное отклонение генеральной совокупности по результатам предшествующих исследований [9, 11]. Основываясь на полученных расчетах, методом случайной выборки выделили истории болезни 116 пациентов, из которых 45 – лица мужского пола, 71 – женского. Медиана возраста больных составила 64 года, нижний и верхний квартили – 58 и 70 лет.

Все больные получали комбинированное лечение, включающее неоадьювантную лучевую или химиолучевую терапию при локализованных и местнораспространенных формах рака прямой кишки, радикальную хирургическую операцию и адьювантную химиотерапию по показаниям при раке ободочной и прямой кишки.

После радикального лечения у пациентов первой группы (n=96) не возникло рецидива заболевания в виде метастатического поражения печени. Во второй группе ранее радикально леченных больных (n=20) развивался рецидив КРР в виде метастазов в печени и других органах.

Объем выполненных операций на прямой и ободочных кишках в первой и второй группах: брюшно-анальная резекция прямой кишки (n=5 и n=1, в обструктивном варианте – n=4 и n=1), брюшно-промежностная экстирпация прямой кишки (n=4 и n=0), передняя резекция прямой кишки (n=26 и n=8, в обструктивном варианте – n=4 и n=2), левосторонняя гемиколэктомия (n=6 и n=2, в обструктивном варианте – n=2 и n=1), правосторонняя гемиколэктомия (n=19 и n=2), колэктомия (n=1 и n=0), резекция поперечно-ободочной кишки (n=1 и n=1, в обструктивном варианте – n=1 и n=0), сигмоидэктомия (n=15 и n=1, в обструктивном варианте – n=1 и n=0), эндоскопическая полипэктомия (n=9 и n=1).

Больные раком прямой кишки по показаниям получали предоперационную дистанционную гамма-терапию в динамическом (в первой группе – n=23, во второй – n=2), классическом (n=4 и n=2), крупном (n=1 и n=0) и средних (n=4 и n=0) режимах фракционирования, СОД 44 Гр на опухоль и пути регионального метастазирования. При назначении лучевой терапии с неоадьювантной химиотерапией для радиомодификации применялись препараты лейковарин, 5-фторурацил или цисплатин (в первой группе – n=4, во второй – n=1). В обеих группах несколько пациентов не получали показанную для их стадии заболевания неоадьювантную лучевую (n=4 и n=6) и химиолучевую терапию (n=6 и n=3) из-за тяжелого состояния или вследствие нарушений клинических рекомендаций.

Для адьювантного лечения рака ободочной кишки II стадии с низкой дифференцировкой опухоли, сосудистой и периневральной инвазией, наличием кишечной непроходимости, перфорации

и других факторов риска, а также рака ободочной кишки III стадии и местнораспространенного рака прямой кишки (РПК) применяли схемы химиотерапии фторпиримидинами LF (лейковарин / 5-фторурацил) – режим Мейо (в первой группе – n=12, во второй – n=7), или фторпиримидинами в комбинации с оксалиплатином в варианте FOLFOX, либо иринотеканом – FOLFIRI (в первой группе – n=5, во второй – n=0). В первой группе также применяли капецитабин (n=2). В обеих группах несколько пациентов (n=13 и n=7) не получали показанную адьювантную химиотерапию по указанным выше причинам.

Используя протоколы оперативных вмешательств и гистологических заключений, производили регистрацию следующих критериев: стадия заболевания, показатели T, N, G; максимальный размер опухоли; инвазия опухоли в мезоколон или мезоректум; наличие периневрального роста и опухолевых эмболов; выполнение УЗИ, МСКТ, МРТ печени до операции; наличие параканкрозного инфильтрата, абсцесса и перфорации опухоли; наличие клеточек опухоли в краях резекции; выполнение интраоперационного УЗ-сканирования печени на предмет метастазов; продолжительность операции и послеоперационная кровопотеря, а также несоблюдение клинических рекомендаций.

С целью повышения валидности в оценке факторов риска каждую группу разделили на подгруппы в соответствии с нозологическими единицами: подгруппы 1А (n=59) и 2А (n=15) – больные раком ободочной кишки, 1Б (n=37) и 2Б (n=5) – больные раком прямой кишки.

Для статистической обработки полученного материала применяли тесты на нормальность распределения Shapiro-Wilk и Колмогорова – Смирнова, определяли значимость различий с помощью непараметрического Mann-Whitney U Test, тестов ANOVA. Для анализа взаимосвязи факторов риска с развитием рецидива применяли коэффициент корреляции Spearman и метод множественной регрессии. Анализ для факторов риска возникновения метастазов рака прямой кишки (подгруппы 1Б и 2Б) и рака ободочной кишки (подгруппы 1А и 2А) проводили отдельно.

Результаты

За исследуемый период метастазы возникли в 20 наблюдениях. Частота развития метастазов в печени составила 17 %. В 2006 г. на 1-м году после лечения метастатическое поражение возникло в 2 случаях, на 2-м году – в 1 наблюдении. В 2007 г. на 1-м году метастазы возникли в 2 случаях. В 2008 г. на 1-м году метастазы возникли в 1 наблюдении, через 9 лет – ещё в 1 случае. В 2010 г. на 2-м году метастатические очаги возникли у 2 больных. В 2011 г. на 3-м году после лечения метастазы возникли в 1 наблюдении. В 2013 г. на 1-м году метастазы возникли в 2 случаях, на 2-м году – в 1,

на 3-м году – в 1, на 4-м году – в 1 наблюдении. В 2014 г. на 1-м году после лечения метастатическое поражение печени возникло у 2, на 2-м году – у 1, на 3-м году – у 1 пациента. В 2015 г. на 1-м году метастазы возникли у 1 больного. Медиана выявления новых случаев метастатического поражения печени из 116 ранее радикально леченных больных колоректальным раком составила 2 пациента в год (3 и 0 – верхний и нижний квартили).

Через 6 мес с момента завершения радикального лечения метастазы в печени возникли в 1 (5 %) наблюдении, через 9 мес – в 1 (5 %), через 12 мес – в 2 (10 %), через 15 мес – в 4 (20 %), через 18 мес – в 4 (20 %), через 24 мес – в 3 (15 %), через 36 мес – в 3 (15 %), через 48 мес – в 1 (5 %), через 96 мес – в 1 (5 %) случае. Максимум возникновения метастазов в печени после завершения лечения приходится на период 12–18 мес. Медиана возникновения метастазов в печени – 16,5 мес после лечения (23 и 13 – верхний и нижний квартили).

Наиболее значимыми для развития метастатического поражения печени у ранее радикально леченных больных раком ободочной кишки факторами с прямой связью являются (по убыванию силы корреляционной связи): перфорация опухоли (умеренная связь: $b=0,656$, $p=0,046$), инвазия в параколярную клетчатку, мезоколон или мезосигму (умеренная связь: $b=0,457$, $p=0,001$), периневральный рост опухоли (умеренная связь: $b=0,428$, $p=0,002$) и стадия опухолевого процесса (умеренная связь: $b=0,416$, $p=0,008$), более молодой возраст пациентов (слабая связь: $b=0,0077$, $p=0,0342$). Значимым фактором с обратной связью умеренной силы ($b=-0,363$, $p=0,003$) у этой группы больных является ультразвуковое сканирование печени, выполненное непосредственно перед планируемой операцией.

В ранние сроки метастазы в печени у ранее радикально леченных больных раком ободочной кишки значительно чаще возникают у пациентов, которым на дооперационном этапе не было выполнено УЗИ печени ($p=0,0002$), а также при поражении опухолью регионарных лимфатических узлов ($p=0,0209$), при наличии опухолевых эмболов ($p=0,0072$) и инвазии опухоли в параколярную клетчатку ($p=0,0129$). Рецидив заболевания у более молодых больных наблюдается значительно чаще ($p=0,0427$): медиана возраста больных с метастазированием – 59 лет (64 – верхний, 52 – нижний квартиль), у пациентов без рецидива заболевания – 65 лет (72 – верхний, 59 – нижний квартиль). У больных раком ободочной кишки, получавших адъювантную химиотерапию, метастазы в печени возникают значительно реже ($p=0,013$).

Значимыми факторами для развития рецидива в виде метастатического поражения печени у ранее радикально леченных больных РПК являются (по убыванию): стадия опухолевого процесса (умеренная связь: $b=0,638$, $p=0,002$), инвазия опухоли

в мезоректум (умеренная связь: $b=0,345$, $p=0,0199$). Значимым фактором с обратной связью умеренной силы ($b=-0,363$, $p=0,003$) является проведение неоадъювантной химиолучевой терапии. Метастазы в печени у ранее радикально леченных больных раком прямой кишки значительно чаще возникают при III стадии процесса ($p=0,0342$).

Пациенты, попавшие в группу риска и не посещавшие плановое послеоперационное обследование, в последующем, как правило, поступают с выраженным метастатическим поражением печени ($p=0,0352$).

Обсуждение

Ежегодно в среднем в Иркутской области выявляют $11,8 \pm 5$ новых случаев метастатического поражения печени у ранее радикально леченных больных КРР. Частота развития метастазов колоректального рака в печени у ранее радикально леченных больных, согласно данным проведенного исследования, составляет 17 %, по данным литературы, – 10,3 % [8]. Пик развития метастазов в печени после завершения радикального лечения приходится на 12–18 мес. У большинства пациентов метастазы возникают через 16,5 мес после лечения (23 и 13 – верхний и нижний квартили).

О.Н. Черипко [11] выделяет 3 группы значимых факторов: связанные с биологическими особенностями организма; с первичной опухолью и с характером проводимого лечения. В.М. Ефетов с соавт. указывают, что сочетание неблагоприятных факторов разных групп повышает риск возникновения рецидива [9]. Согласно нашим данным, прогностически значимыми факторами развития метастазов в печени у ранее радикально леченных больных КРР являются: стадия опухолевого процесса, наличие роста в пара- и мезоколярную, параректальную клетчатку, отсутствие предоперационной химиолучевой терапии и адъювантной химиотерапии.

Немаловажными факторами риска могут являться лабораторные показатели. По данным P.R.C. Ding et al., к группе риска раннего метастазирования после радикального лечения относятся больные раком ободочной кишки, начиная с IIa стадии, у которых перед операцией в общем анализе крови определяется нарушение соотношения лимфоцитов и нейтрофилов со значительным преобладанием последних [12].

Прогнозирование метастатического поражения печени у радикально леченных больных КРР возможно по данным молекулярно-генетического анализа: тесная прямая связь с метастатическим поражением печени у данной категории пациентов отмечается при экспрессии гена *CXCR4* и мутации в генах *KRAS* [13–15]. Однако большинство существующих молекулярных маркеров не являются универсальными для всех типов опухолей толстой кишки, что снижает их эффективность [16, 17].

Помимо этого, исследование большинства из них затруднительно и дорого для клинической практики [17].

Рассмотрение всех факторов, имеющих значимую связь с развитием метастазов в печени, показало, что они представлены 2 группами. Первая – факторы, «независимые» от онколога (на которые он повлиять не может): стадия опухолевого процесса, наличие роста в параколярную, мезоколярную клетчатку, индекс N – по нашим данным, нарушение соотношения лимфоцитов и нейтрофилов [12], а также мутации в генах *KRAS* и *p53*, экспрессия гена *CXCR4* [14, 15, 17]. Вторая группа – факторы, «зависящие» от онколога (на которые он может влиять): невыполнение предоперационной химиолучевой терапии, адъювантной химиотерапии.

Группа риска по развитию метастазов в печени у ранее радикально леченных больных колоректальным раком включает пациентов, у которых не были соблюдены клинические рекомендации, нарушены сроки проведения адъювантного лечения, выявлены морфологические признаки рас-

пространенного опухолевого процесса. В группе риска в послеоперационном периоде 1 раз в 3 мес необходимо исследовать раковый эмбриональный антиген (СЕА), выполнять МСКТ органов брюшной полости с внутривенным усилением, биопсию очагов в печени, подозрительных в отношении метастатического поражения.

Заключение

В противовес активно обсуждаемой теме синхронного метастатического поражения печени при колоректальном раке проблема метастазирования у радикально леченных больных остается малоизученной, вследствие этого отсутствуют рекомендации по прогнозированию, раннему выявлению и профилактике данного явления. Определенные в нашем исследовании значимые факторы риска развития рецидива заболевания, а также вытекающие из этого рекомендации призваны улучшить прогнозирование возникновения метастазов, отдалить сроки рецидивирования и повысить своевременное выявление метастатического поражения у данного контингента больных.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (3): 5–11. [Axel' E.M. Gastrointestinal cancer statistics. Siberian Journal of Oncology. 2017; 16 (3): 5–11. (in Russian)]. doi: 10.21294/1814-4861-2017-3-5-11.
2. Алиев Ф.Ш., Десятов Е.Н., Крутских А.Г., Алиев В.Ф., Лейманченко П.И. Эпидемиология колоректального рака: мировые и региональные тенденции. Медицинская наука и образование Урала. 2016; 17 (4): 125–128. [Aliiev F.Sh., Desyatov E.N., Krutskih A.G., Aliiev V.F., Leimanchenko P.I. The epidemiology of colorectal cancer: world and regional tendencies. Medical Science and Education of Ural. 2016; 17 (4): 125–128. (in Russian)].
3. Патютко Ю.И., Сагайдак И.В., Поляков А.Н., Подлужный Д.В., Черноглазова Е.В., Чистякова О.В., Косырев В.Ю. Хирургическое и комбинированное лечение больных колоректальным раком с метастатическим поражением печени. Онкологическая колопроктология. 2011; 1: 32–40. [Patyutko Y.I., Sagaidak I.V., Polyakov A.N., Podluzhny D.V.I., Chernoglazova E.V., Chistyakova O.V., Chuchuyev E.S., Gakhramanov A.D., Kosyrev V.Y. Surgery and chemotherapy plus surgery for patients with colorectal cancer liver metastases. Colorectal Oncology. 2011; 1: 32–40. (in Russian)].
4. Cady B., McDermott W.V. Major hepatic resection for metachronous metastases from colon cancer. Ann Surg. 1985 Feb; 201 (2): 204–9.
5. Сакаева Д.Д. Адъювантное и неадъювантное лечение больных раком ободочной и прямой кишки. Практическая онкология. 2005; 6 (2): 103–111. [Sakaeva D.D. Adjuvant and neoadjuvant treatment of colorectal cancer patients. Practical Oncology. 2005; 6 (2): 103–111. (in Russian)].
6. de Gramont A., Figer A., Seymour M., Homerin M., Hmissi A., Cassidy J., Boni C., Cortes-Funes H., Cervantes A., Freyer G., Papamichael D., Le Bail N., Louvet C., Hendler D., de Braud F., Wilson C., Morvan F., Bonetti A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. J Clin Oncol. 2000 Aug; 18 (16): 2938–47. doi: 10.1200/JCO.2000.18.16.2938.
7. Афанасьев С.Г., Старцева Ж.А., Тарасова А.С., Усова А.В., Самцов Е.Н. Результаты комбинированного лечения рака прямой кишки с применением пролонгированной предоперационной химиолучевой терапии. Сибирский онкологический журнал. 2012; 6: 5–12. [Afanasyev S.G., Startseva Zh.A., Tarasova A.S., Usova A.V., Samstov E.N. Results of combined modality treatment including preoperative prolonged chemotherapy for rectal cancer. Siberian Journal of Oncology. 2012. 6: 5–12. (in Russian)].
8. Mekenkamp L.J., Koopman M., Teerenstra S., van Krieken J.H., Mol L., Nagtegaal I.D., Punt C.J. Clinicopathological features and outcome in advanced colorectal cancer patients with synchronous vs metachronous

metastases. Br J Cancer. 2010 Jul 13; 103 (2): 159–64. doi: 10.1038/sj.bjc.6605737.

9. Ефетов В.М., Ефетов С.В., Черпунко О.Н. Рецидивы рака прямой кишки. Онкология. 2006; 8 (2): 176–180. [Efetov V.M., Efetov S.V., Cheripko O.N. Rectal cancer relapses. Oncology. 2006; 8 (2): 176–180. (in Russian)].

10. Беляева А.В., Моисеенко А.Б., Гуляев А.В. Современные представления о прогностических факторах колоректального рака. Вопросы онкологии. 2011; 57 (3): 279–285. [Belyaev A.V., Moiseenko A.B., Gulyaev A.V. Current views on prognostic factors for colorectal cancer. Problems in Oncology. 2011; 57 (3): 279–285. (in Russian)].

11. Черпунко О.Н. Факторы, влияющие на частоту возникновения рецидивов рака прямой кишки. Онкология. 2002; 4 (3): 206–208. [Cheripko O.N. Factors effecting the frequency of relapses of rectal cancer. Oncology. 2002; 4 (3): 206–208. (in Russian)].

12. Ding P.R., An X., Zhang R.X., Fang Y.J., Li L.R., Chen G., Wu X.J., Lu Z.H., Lin J.Z., Kong L.H., Wan D.S., Pan Z.Z. Elevated preoperative neutrophil to lymphocyte ratio predicts risk of recurrence following curative resection for stage IIA colon cancer. Int J Colorectal Dis. 2010 Dec; 25 (12): 1427–33. doi: 10.1007/s00384-010-1052-0.

13. Kim J., Takeuchi H., Lam S.T., Turner R.R., Wang H.J., Kuo C., Hoon D.S. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. J Clin Oncol. 2005 Apr 20; 23 (12): 2744–53. doi: 10.1200/JCO.2005.07.078.

14. Hutchins G., Southward K., Handley K., Magill L., Beaumont C., Stahlschmidt J., Richman S., Chambers P., Seymour M., Kerr D., Gray R., Quirke P. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. J Clin Oncol. 2011 Apr 1; 29 (10): 1261–70. doi: 10.1200/JCO.2010.30.1366.

15. Мазуренко Н.Н., Гагарин И.М., Цыганова И.В., Мочальникова В.В., Бредер В.В., Горбунова В.А. Частота и спектр мутаций KRAS в метастатическом колоректальном раке. Вопросы онкологии. 2013; 59 (6): 751–755. [Mazurenko N.N., Gagarin I.M., Tsyganova I.V., Mochalnikova V.V., Breder V.V., Gorbunova V.A. The frequency and spectrum of KRAS mutations in metastatic colorectal cancer. Problems in Oncology. 2013; 59 (6): 751–755. (in Russian)].

16. Ильянатов Е.Н. Клинико-молекулярные аспекты колоректального рака: этиопатогенез, профилактика, индивидуализация лечения. Практическая онкология. 2005; 6 (2): 65–70. [Imyanitov E.N. Clinical and molecular aspects of colorectal cancer: etiopathogenesis, prevention, treatment individualization. Practical Oncology. 2005; 6 (2): 65–70. (in Russian)].

17. Müller O. Identification of colon cancer patients by molecular diagnosis. Dig Dis. 2003; 21 (4): 315–319. doi: 10.1159/000075354.

Поступила/Received 24.04.18

Принята в печать/Accepted 14.05.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Расулов Родион Исмагилович, доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования (г. Иркутск, Россия). E-mail: gava2010@yandex.ru. SPIN-код: 3520-6049. AuthorID (РИНЦ): 419107.

Юдин Андрей Андреевич, аспирант кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, Иркутский государственный медицинский университет (г. Иркутск, Россия). E-mail: inside-your-mind@yandex.ru. SPIN-код: 7630-2196. AuthorID (РИНЦ): 909380. Researcher ID (WOS): Q-7590-2017.

Сонголов Геннадий Игнатьевич, доцент кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, Иркутский государственный медицинский университет (г. Иркутск, Россия). E-mail: kahohta@rambler.ru. SPIN-код: 4008-8488. AuthorID (РИНЦ): 627786.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность главному врачу ООД проф. В.В. Дворнеченко за возможность исследовать клинический материал.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Rodion I. Rasulov, MD, DSc, Professor, Department of Oncology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education (Irkutsk, Russia). E-mail: gava2010@yandex.ru.

Andrey A. Yudin, Postgraduate, Department of Surgery and Topographic Anatomy, Irkutsk State Medical University (Irkutsk, Russia). E-mail: inside-your-mind@yandex.ru. Researcher ID (WOS): Q-7590-2017.

Gennady I. Songolov, MD, Associate Professor, Department of Surgery and Topographic Anatomy, Irkutsk State Medical University (Irkutsk, Russia). E-mail: kahohta@rambler.ru.

Funding

This study required no funding.

Acknowledgments

Authors would like to thank professor V.V. Dvornechenko, the head of Irkutsk Regional Cancer Center, for providing clinical materials.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Для цитирования: Дмитриева Н.В., Агинова В.В., Петухова И.Н., Григорьевская З.В., Дмитриева А.И., Багирова Н.С., Терещенко И.В., Хмаладзе Е.Н. Нозокомиальные инфекции, вызванные бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, в онкологической клинике. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 36–42. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-36-42.

For citation: Dmitrieva N.V., Aginova V.V., Petukhova I.N., Grigorievskaya Z.V., Dmitrieva A.I., Bagirova N.S., Tereshchenko I.V., Khmaladze E.N. Nosocomial infections caused by bacteria of *enterobacteriaceae* family in cancer clinic Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 36–42. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-36-42.

НОЗОКОМИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ БАКТЕРИЯМИ СЕМЕЙСТВА *ENTEROBACTERIACAE*, В ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ КЛИНИКЕ

Н.В. Дмитриева¹, В.В. Агинова^{1,2}, И.Н. Петухова¹, З.В. Григорьевская¹,
А.И. Дмитриева¹, Н.С. Багирова¹, И.В. Терещенко¹, Е.Н. Хмаладзе¹

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, г. Москва, Россия¹

Россия, г. Москва, 115478, Каширское шоссе, 24. E-mail: prof.ndmitrieva@mail.ru¹

ГБПОУ МЗ «Медицинский колледж №1», г. Москва, Россия²

Россия, г. Москва, 127206, Чуксин тупик, 6²

Аннотация

Цель исследования – проанализировать частоту выделения мультирезистентных (MDR) возбудителей госпитальных инфекций – *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. **Материал и методы.** Проанализировано 862 штамма *E. coli* и 1 461 штамм *K. pneumoniae*, выделенных в 2014–16 гг. из раневого отделяемого, крови, мочи и других патологических материалов от онкологических больных, находившихся в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ. **Результаты.** За 3 года отмечено значимое ($p \leq 0,0001$) увеличение числа *E. coli*, устойчивых к пиперациллину-тазобактаму (с 8,1 до 25 %), цефтриаксону (с 15,7 до 100 %), эртапенему (с 8,1 до 97,7 %), амикацину (с 4,5 до 14,6 %). Количество *E. coli*, продуцирующих карбапенемазы, увеличилось с 5,8 до 20,8 % ($p \leq 0,0001$). Среди *K. pneumoniae* отмечено значимое ($p \leq 0,0001$) увеличение числа штаммов, устойчивых к пиперациллину-тазобактаму (с 59,7 до 89,7 %), цефтазидиму (с 62,8 до 82,8 %), цефтриаксону (с 62,8 до 100 %), цефепиму (с 63,1 до 83,8 %), эртапенему (с 62,1 до 100 %), имипенему (с 30,0 до 81,0 %), меропенему (с 53,9 до 86,8 %). **Заключение.** Оценка частоты выделения MDR-микроорганизмов в динамике является важнейшим элементом эпидемиологического надзора и необходима для правильного лечения пациентов с инфекционными осложнениями.

Ключевые слова: энтеробактерии, мультирезистентные микроорганизмы, MDR, XDR, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, онкологические больные, внутрибольничные инфекции, антибактериальные препараты, лекарственная устойчивость.

NOSOCOMIAL INFECTIONS CAUSED BY BACTERIA OF *ENTEROBACTERIACAE* FAMILY IN CANCER CLINIC

N.V. Dmitrieva¹, V.V. Aginova^{1,2}, I.N. Petukhova¹, Z.V. Grigorievskaya¹,
A.I. Dmitrieva¹, N.S. Bagirova¹, I.V. Tereshchenko¹, E.N. Khmaladze¹

I.V. Tereshchenko¹, E.N. Khmaladze¹

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia¹

24, Kashirskoe shosse, 115478-Moscow, Russia. E-mail: prof.ndmitrieva@mail.ru¹

Medical college №1, Moscow, Russia²

6, Chuksin tupik, 127206-Moscow, Russia²

Abstract

The purpose of the study was to analyze the prevalence of multidrug-resistant (MDR) pathogens (*Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*) isolated from cancer patients. **Material and Methods.** 862 strains of *E. coli* and 1 461 strains of *K. pneumoniae* isolated from wound, blood, urine and other pathological materials from cancer patients treated at N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (Moscow) between 2014 and 2016 were analyzed. **Results.** Over the last 3 years, there has been a significant increase in the number of *E. coli* resistant to piperacillin-tazobactam (from 8.1 to 25 %), ceftriaxone (from 15.7 to 100 %), ertapenem (from 8.1 to 97.7 %), and amikacin (с 4.5 to 14.6 %). The number of *E. coli* producing carbapenemases has increased from 5.8 to 20.8 % ($p \leq 0.0001$). Among *K. pneumoniae*, a significant increase in the number of strains resistant to piperacillin-tazobactam (from 59.7 to 89.7 %), ceftazidime (from 62.8 to 82.8 %), ceftriaxone (from 62.8 to 100 %), cefepime (from 63.1 to 83.8 %), ertapenem (from 62.1 to 100 %), imipenem (from 30.0 to 81.0 %), and meropenem (from 53.9 to 86.8 %) is observed. **Conclusion.** Evaluation of the frequency of isolation of MDR microorganisms over time is an essential element of epidemiological surveillance and is necessary for the correct treatment of patients with infectious complications.

Key words: enterobacteria, multiresistant microorganisms, MDR, XDR, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, cancer patients, nosocomial infections, antibacterial drugs, drug resistance.

Нозокомиальные инфекции (НИ) представляют серьезную проблему для клиник, особенно онкологических. Нозокомиальные инфекции – это группа различных инфекций, объединенных по признаку общего эпидемиологического характера инфицирования, возникающих в стационаре спустя 24–72 ч после госпитализации больного. Онкологические больные являются группой риска в отношении развития НИ [1]. Частота инфекционных осложнений в различных группах онкологических больных составляет от 12 до 50 %, а среди больных лейкозами достигает 75 % [2]. В последние годы отмечается значительное увеличение интереса к проблеме нозокомиальных инфекций в связи с высоким уровнем заболеваемости и связанным с этим серьезным социально-экономическим ущербом. По данным ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ, ежегодное количество госпитальных инфекций составляет не менее 2–2,5 млн случаев в год, а ежегодный экономический ущерб – более 5 млрд руб. [3].

Спектр возбудителей инфекционных осложнений у онкологических больных широк и разнообразен. Он включает аэробные и анаэробные бактерии, патогенные грибы, вирусы, простейшие, однако ведущими возбудителями являются грамотрицательные неферментирующие бактерии (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*), характеризующиеся множественной лекарственной устойчивостью.

Пациенты с инфекциями, вызванными резистентными бактериями, имеют повышенный риск отрицательных клинических результатов и летального исхода, а также потребляют больше медицинских ресурсов, чем пациенты, инфицированные чувствительными к антибиотикам штаммами тех же возбудителей [4]. Например, устойчивость *Klebsiella pneumoniae* – распространенной кишечной бактерии, которая может вызывать угрожающие жизни инфекции и резистентной к карбапенемам, препаратам, используемым в качестве «последней лечебной возможности», – распространилась на все

регионы мира [5]. *K. pneumoniae* часто становится причиной внутрибольничных инфекций, таких как пневмонии, инфекции кровотока, а также инфекции новорожденных и пациентов отделений интенсивной терапии. В некоторых странах из-за развившейся устойчивости *K. pneumoniae* к карбапенемам они оказываются неэффективны при лечении более чем половины пациентов с этой инфекцией [6, 7].

Широкое распространение получила устойчивость *E. coli* к фторхинолонам, антибиотикам, наиболее часто применяемым при лечении инфекций мочевыводящих путей. Теперь во многих странах и на разных континентах терапия фторхинолонами неэффективна более чем в половине случаев. Количество карбапенем-резистентных вариантов несколько меньше, чем у клебсиелл, и обычно не превышает 30 % [8]. Согласно данным по Европейскому региону, НИ приводят к значительному увеличению нагрузки на экономику и здравоохранение европейских стран: число пациентов, погибших в результате внутрибольничных инфекций, вызванных резистентными бактериями, ежегодно превышает 25 тысяч человек [9]. Помимо роста уровня заболеваемости и смертности, среди пациентов, следует принимать во внимание и такие факторы, как увеличение сопутствующих расходов на здравоохранение, которые ежегодно составляют более 1,5 млрд евро [10]. В последние годы к проблеме антимикробной резистентности (АМР) усилено внимание со стороны не только врачей, но и политиков, экономистов, так как АМР преодолела межгосударственные границы и получила повсеместное распространение [11]. В Российской Федерации также предпринята попытка разработки стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности на период до 2030 г. [12].

Материал и методы

Работа выполнена в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Проана-

лизирована таксономическая структура микроорганизмов (без учета грибковой микрофлоры), выделенных в 2014–2016 гг. из 24 357 патологических биоматериалов от онкологических больных, проходивших лечение в клинике. Пристальное внимание было уделено наиболее часто выделяемым микроорганизмам, общее количество которых составило 6 218 (52,1 %). Данные микроорганизмы являются клинически значимыми и были устойчивы к большинству антибактериальных препаратов. Все изоляты были идентифицированы до вида колориметрическим методом на анализаторах «Microscan WalkAway – 40 SI» (Siemens Healthcare Diagnostics, США) и «Vitek 2» (BioMérieux, Франция), а также методом матрично-ассоциированной лазерной десорбции/ионизации – времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF) и программного обеспечения MALDI Biotyper v.3.0 (Bruker Daltonics, Германия).

Результаты

Исследованию подвергались такие биоматериалы, как отделяемое нижних дыхательных путей (ОНДП), полученное при бронхоскопии, бронхоальвеолярном лаваже, посевах мокроты, а также отделяемое по дренажам (ОД) и раневое отделяемое (РО), моча, кровь, прочие патологические материалы (кал, ликвор, аспират суставной жидкости, мазки и т. д.) (табл. 1).

Причиной инфекционных осложнений нижних дыхательных путей в 21,0 % случаев являлась *K. pneumoniae*. Число выделенных из ОНДП штаммов было больше, чем из мочи (18,7 %) ($p>0,05$), однако разница была недостоверна, в то время как из мочи (18,7 %) и ОД + РО (15,9 %) *K. pneumoniae* выделялись достоверно чаще, чем из крови (3,9 %) ($p<0,0001$).

E. coli становилась причиной инфекций мочевыводящих путей в 67,9 % случаев, что достоверно выше частоты ее выделения при инфекциях нижних дыхательных путей (5,9 %), инфекциях кровотока (6,6 %) и частоты выделения данного микроорганизма в отделяемом из дренажей и ран (13,6 %). Разница статистически достоверна ($p<0,0001$). Причем число выделенных штаммов из ОД + РО больше, чем из ОНДП и крови ($p<0,0001$).

В ходе исследований также был проведен анализ выявления резистентных штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* из патологических материалов от больных. В период исследований отмечена тенденция к увеличению устойчивости кишечной палочки к ингибитор-защищенным пенициллинам (табл. 2). Установлена достоверная разница в увеличении количества резистентных штаммов к пиперациллину/тазобактаму с 8,1 % в 2014 г. до 15,8 % в 2015 г. ($p<0,05$) и до 25,1 % в 2016 г. ($p<0,0001$). По отношению к ампициллину/сульбактаму число устойчивых штаммов в 2014 г. составило 58,6 %, а в 2015 г. – 62,8 %.

Таблица 1

Частота выделения проблемных грамотрицательных микроорганизмов из патологических материалов, 2014–16 гг.

Виды патологических материалов	Виды грамотрицательных аэробных микроорганизмов (n=4104)	
	<i>K. pneumoniae</i> (n=1461, 37,4 %)	<i>E. coli</i> (n=862, 23,2 %)
ОНДП	307 (21,0 %)	51 (5,9 %)
ОД + РО	233 (15,9 %)	117 (13,6 %)
Моча	274 (18,7 %)	285 (67,9 %)
Кровь	58 (3,9 %)	57 (6,6 %)
Прочие	489 (33,5 %)	350 (40,6 %)

Таблица 2

Динамика выявления устойчивых к антибиотикам штаммов *E. coli*

Препараты	Годы/количество штаммов <i>E. coli</i>		
	2014 г. (n=223)	2015 г. (n=227)	2016 г. (n=403)
Ампициллин/сульбактам	130 (58,6 %)	121 (53,3 %)	253 (62,8 %)
Пиперациллин/тазобактам	18 (8,1 %)	36 (15,8 %)	101 (25,1 %)
Цефтазидим	41 (18,3 %)	42 (18,5 %)	120 (29,8 %)
Цефтриаксон	35 (15,7 %)	47 (20,7 %)	403 (100,0 %)
Цефепим	33 (14,7 %)	40 (17,6 %)	106 (26,3 %)
Имипенем	7 (3,1 %)	11 (4,8 %)	68 (16,9 %)
Меропенем	13 (5,8 %)	15 (6,6 %)	84 (20,8 %)
Эртапенем	18 (8,1 %)	27 (11,8 %)	394 (97,7 %)
Амикацин	10 (4,5 %)	18 (7,9 %)	59 (14,6 %)
Ципрофлоксацин	77 (34,5 %)	106 (46,7 %)	193 (47,8 %)
Триметоприм/сульфаметоксазол	100 (44,8 %)	102 (44,9 %)	209 (51,8 %)

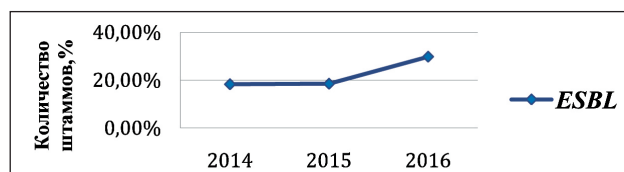


Рис. 1. Динамика частоты выделения *E. coli*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия (ESBL – бета-лактамазы расширенного спектра действия)

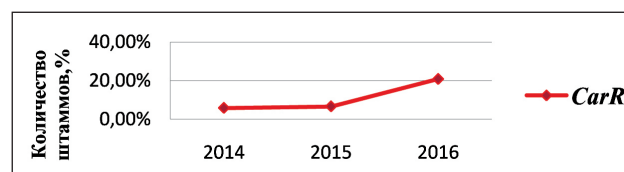


Рис. 2. Динамика частоты выделения карбапенем-резистентных (*CarR*- карбапенем-резистентный штамм) *E. coli*

в 2015 г. незначительно снизилось – до 53,3 %, а в 2016 г. возросло до 62,8 %, однако достоверной разницы обнаружено не было ($p>0,05$).

По отношению к цефалоспорином число устойчивых штаммов увеличилось. Причем, если к цефтазидину и цефепиму наблюдался постепенный достоверный рост числа устойчивых штаммов (18,3–29,8 % и 14,7–26,3 % соответственно), то количество штаммов, устойчивых к цефтриаксону, в 2016 г. составило 100,0 % против 15,7 % в 2014 г. Разница достоверна ($p\leq 0,0001$).

В 2016 г. существенно увеличилось выделение карбапенем-резистентных кишечных палочек. Так, число штаммов, резистентных к эртапенему, возросло с 8,1 % в 2014 г. до 97,7 % в 2016 г. По отношению к имипенему и меропенему общий процент устойчивых штаммов был невелик (немного более 20 %), однако наблюдалась тенденция к увеличению количества таких штаммов с 3,1 % до 16,9 % для имипенема и от 5,8 % до 20,8 % для меропенема ($p\leq 0,0001$).

При анализе устойчивости кишечной палочки к аминогликозидам (амикацин) была обнаружена достоверная разница в увеличении количества устойчивых штаммов с 4,5 % в 2014 г. до 14,6 % в 2016 г. ($p\leq 0,0001$), однако общее количество таких штаммов незначительно. По отношению к фторхинолонам (ципрофлоксацин) резистентных штаммов за период исследований было выделено менее 50 %, при этом достоверного увеличения (34,5–47,8 %) в динамике не отмечалось. Коли-

чество устойчивых штаммов к триметоприму/сульфаметоксазолу в период 2014–15 гг. не изменилось и составило 44,8–44,9 %, а в 2016 г. их число увеличилось до 51,8 % ($p>0,05$). Разница недостоверна ($p>0,05$).

Динамика частоты выделения продуцентов бета-лактамаз расширенного спектра действия (англ. – ESBL) и карбапенем-резистентных (*CarR*) штаммов *E. coli* за период 2014–16 гг. представлена на рис. 1 и 2. В период 2014–2016 гг. произошло увеличение частоты выделения ESBL-продуцентов с 18,3 % до 29,8 % ($p<0,05$) и *CarR* штаммов *E. coli* с 5,8 % до 20,8 % ($p\leq 0,0001$). В табл. 3 показана динамика устойчивости *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам.

Анализ данных показал, что *K. pneumoniae* характеризуются высоким процентом резистентных штаммов к большому количеству антибиотиков. На протяжении 2014–2016 гг. происходило нарастание числа устойчивых штаммов *K. pneumoniae* практически ко всем применяемым антибиотикам. Отмечено увеличение количества устойчивых штаммов к «защищенным» антибиотикам пенициллинового ряда. Так, число резистентных к ампициллину/сульбактаму штаммов увеличилось за период 2014–2015 гг. незначительно – с 77,7 до 78,8 % ($p>0,05$), а в 2016 г. – до 89,8 %. Разница за период 2014–16 гг. достоверна ($p\leq 0,0001$). Число устойчивых штаммов к пиперациллину/тазобактаму увеличилось с 59,7 % в 2014 г. до 87,9 % в 2016 г. ($p\leq 0,0001$). Произошло дальнейшее

Таблица 3

Динамика выявления устойчивых к антибиотикам штаммов *K. pneumoniae*

Препараты	Годы/количество штаммов		
	2014 г. (n=293)	2015 г. (n=402)	2016 г. (n=766)
Ампициллин/сульбактам	213 (77,7 %)	317 (78,8 %)	688 (89,8 %)
Пиперацillin/тазобактам	175 (59,7 %)	277 (68,9 %)	667 (87,1 %)
Цефтазидим	184 (62,7 %)	261 (64,9 %)	635 (82,8 %)
Цефтриаксон	184 (62,8 %)	289 (71,9 %)	766 (100,0 %)
Цефепим	185 (63,1 %)	265 (65,9 %)	642 (83,8 %)
Имипенем	88 (30,0 %)	147 (36,7 %)	621 (81,0 %)
Меропенем	158 (53,9 %)	248 (61,9 %)	665 (86,8 %)
Эртапенем	182 (62,1 %)	284 (70,6 %)	766 (100,0 %)
Амикацин	41 (13,9 %)	127 (31,7 %)	168 (21,9 %)
Ципрофлоксацин	187 (63,8 %)	275 (68,4 %)	668 (87,2 %)
Триметоприм/сульфаметоксазол	186 (63,4 %)	260 (64,7 %)	664 (86,6 %)

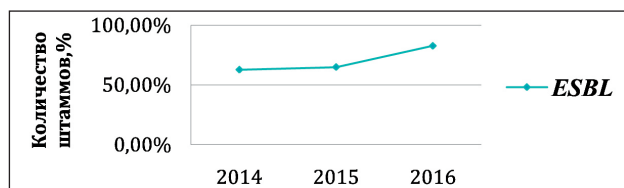


Рис. 3. Частота выделения *ESBL*-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae* за период 2014–16 гг.

увеличение количества резистентных штаммов к цефалоспорином. Так, к препаратам III поколения устойчивость возросла с 62,7 до 82,8 % для цефтазидима ($p \leq 0,0001$) и с 62,8 до 100,0 % ($p \leq 0,0001$) для цефтриаксона. Также достоверно увеличилось число устойчивых штаммов по отношению к цефепиму (IV поколение цефалоспоринов) – с 63,1 % в 2014 г. до 83,8 % в 2016 г. ($p \leq 0,0001$). Аналогично выросло и количество *CarR* штаммов. Значимо повысилась устойчивость к имипенему – с 30,0 % в 2014 г. до 81,0 % в 2016 г. ($p \leq 0,0001$) и к меропенему – с 53,9 % в 2014 г. до 61,9 % в 2015 г. ($p < 0,05$) и до 86,8 % в 2016 г. ($p \leq 0,0001$). Устойчивость к эртапенему в 2016 г. увеличилась до 100,0 против 62,1 % в 2014 г. ($p \leq 0,0001$). Количество резистентных к аминогликозидам (амикацину) штаммов было достаточно невелико (21,9 %), тем не менее отмечен достоверный рост резистентности. В 2014 г. было выделено 13,1 % устойчивых штаммов, в 2015 г. – 31,7 % ($p \leq 0,0001$), в 2016 г. – 21,9 % ($p < 0,002$). Значимо возросла устойчивость к фторхинолонам (ципрофлоксацину) – с 63,8 % в 2014 г. до 87,2 % в 2016 г. ($p \leq 0,0001$). Количество штаммов, нечувствительных к бисептолу (триметоприму/сульфаметоксазолу), в период 2014–15 гг. было примерно на одном уровне (63,4–64,7 %), а в 2016 г. увеличилось до 86,6 % ($p \leq 0,0001$).

Динамика частоты выделения *ESBL*-продуцентов и *CarR* штаммов *K. pneumoniae* за период 2014–16 гг. представлена на рис. 3 и 4. Отмечено достоверное нарастание числа *ESBL*-продуцентов (62,7–82,8%) и *CarR* (53,9–86,8 %) штаммов *K. pneumoniae* ($p \leq 0,0001$).

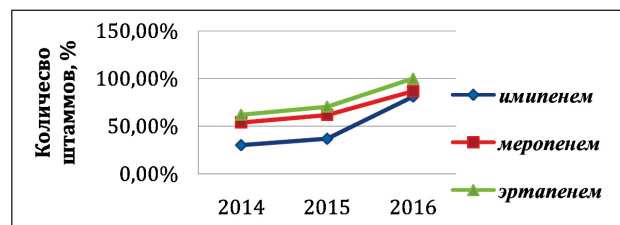


Рис. 4. Частота выделений *CarR* штаммов *K. pneumoniae* за период 2014–16 гг.

Заключение

Таким образом, в 2014–16 гг. увеличилось число резистентных штаммов кишечной палочки по отношению ко всем антибактериальным препаратам. В 2016 г. отмечено резкое увеличение устойчивости к цефтриаксону (до 100,0 %) и эртапенему (до 97,7 %). В исследуемый период времени также увеличилась общая частота выделения штаммов *K. pneumoniae*. Наряду с этим достоверно возросло количество резистентных штаммов. Наибольшая устойчивость отмечена к β -лактамам антибиотикам, наименьшая – к аминогликозидам. В 2016 г. выявлены штаммы *K. pneumoniae*, обладающие 100 % устойчивостью к цефтриаксону и эртапенему. Увеличение роста резистентности возбудителей бактериальных инфекций в настоящее время носит глобальный характер, распространяющийся по всему миру и охватывающий практически все клинически важные микроорганизмы, особенно госпитального происхождения [13]. Появление мульти- и панрезистентных штаммов в значительной степени определяет стратегию и тактику антимикробной терапии и профилактики инфекций в современной медицинской практике. Поэтому проведение микробиологического мониторинга и изучение фенотипа резистентности выделенных штаммов возбудителей являются важнейшим элементом эпидемиологического надзора за госпитальными инфекциями, который позволяет своевременно и адекватно формировать комплекс профилактических и противоэпидемических мероприятий в целях поддержания эпидемиологического благополучия в стационаре.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Maschmeyer G., Haas A. The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31: 193–7.
2. Дмитриева Н.В., Петухова И.Н., Смолянская А.З. Инфекционные осложнения в онкологической клинике. Практическая онкология. 2001; 1 (5): 18–20. [Dmitrieva N.V., Petukhova I.N., Smolyanskaya A.Z. Infectious complications in the oncological clinic. *Practical Oncology*. 2001; 1 (5): 18–20. (in Russian)].
3. Козлов Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000; 2 (1): 16–30. [Kozlov R.S. Nosocomial infections: epidemiology, pathogenesis, prevention, control. *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy*. 2000; 2 (1): 16–30. (in Russian)].
4. Григорьевская З.В., Петухова И.Н., Багирова Н.С., Шильникова И.И., Терещенко И.В., Григорьевский Е.Д., Дмитриева Н.В. Нозокомиальные инфекции у онкологических больных: проблема нарастающей резистентности грамотрицательных микроорганизмов. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (1): 91–97. [Grigorievs-

- kaya Z.V., Petukhova I.N., Bagirova N.S., Shilnikova I.I., Tereshchenko I.V., Grigorievsky E.D., Dmitrieva N.V. Nosocomial infections in cancer patients: problem of gram-negative bacterial resistance. *Siberian Journal of Oncology*. 2017; 16 (1): 91–97. (in Russian)]. doi: 10.21294/1814-4861-2017-16-1-91-97.
5. Kallen A., Guh A. United States centers for disease control and prevention issue updated guidance for tackling carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Euro Surveill*. 2012 Jun 28; 17 (26): pii: 20207.
6. Mazzariol A., Bosnjak Z., Ballarini P., Budimir A., Bedenic B., Kalenic S., Cornaglia G. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerg Infect Dis*. 2012 Mar; 18 (3): 532–4. doi: 10.3201/eid1803.1103890.
7. Poulou A., Voulgari E., Vrioni G., Xidopoulos G., Pliagkos A., Chatzipantazi V., Markou F., Tsakris A. Imported KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in a Greek hospital: impact of infections control measures to restrain their dissemination. *J Clin Microbiol*. 2012 Aug; 50 (8): 2618–23. doi: 10.1128/JCM.00459-12.
8. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016 [Internet]. URL: <http://www.ecdc.europa.eu> (cited 15.05.2018).

9. World Health Organization. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Geneva, 2001. 90.

10. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. ATC/DDD Index. [Internet]. URL: <http://www.whocc.no/atcddd>. (cited 15.05.2018).

11. Дмитриева Н.В., Петухова И.Н., Багирова Н.С., Григорьевская З.В., Дьякова С.А., Терещенко И.В., Соколова Е.Н. Распространенность нозокомиальных микроорганизмов в онкологической клинике. Клиническая лабораторная диагностика. Тезисы II Российского Конгресса лабораторной медицины. М., 2016; 16 (9): 619–620. [Dmitrieva N.V., Petukhova I.N., Bagirova N.S., Grigorievskaya Z.V., Dyakova S.A., Tereshchenko I.V., Sokolova E.N. Prevalence of nosocomial microorganisms in the oncological clinic. Clinical laboratory diagnosis. II Russian Congress of Laboratory Medicine. Moscow, 2016; 16 (9): 619–620. (in Russian)].

12. Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И., Брусина Е.Б., Зуева Л.П., Ковалишина О.В., Стасенко В.Л., Тутельян А.В., Фельдблюм И.В., Шкарин В.В. Национальная концепция профилактики

инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по ее положениям. Нижний Новгород, 2012. 84. [Pokrovsky V.I., Akimkin V.G., Briko N.I., Brusina E.B., Zueva L.P., Kovalishina O.V., Stasenkov V.L., Tutelyan A.V., Feldblyum I.V., Shkarin V.V. The national concept of prevention of infections associated with the provision of medical care, and information material on its provisions. Nizhny Novgorod, 2012; 84. (in Russian)].

13. Дмитриева Н.В., Григорьевская З.В., Багирова Н.С., Петухова И.Н., Терещенко И.В., Шильникова И.И., Кулага Е.В., Калинин Т.А. Инфекции, вызванные мульти- и пан-резистентными микроорганизмами в онкологической клинике. Медицинский алфавит. Современная лаборатория. 2016; 3 (19): 48–49. [Dmitrieva N.V., Grigorievskaya Z.V., Bagirova N.S., Petukhova I.N., Tereshchenko I.V., Shilnikova I.I., Kulaga E.V., Kalinchuk T.A. Infections caused by multi- and pan-resistant microorganisms in an oncology clinic. Medical alphabet. Modern laboratory. 2016; 3 (19): 48–49. (in Russian)].

Поступила/Received 15.05.18
Принята в печать/Accepted 28.06.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Дмитриева Наталья Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии, ФГБУ «РОНЦ им. Блохина» (г. Москва, Россия). E-mail: prof.ndmitrieva@mail.ru. SPIN-код: 4727-2018. AuthorID (РИНЦ): 243733. Author ID (Scopus): 56338598600.

Агинова Виктория Викторовна, преподаватель профессионального модуля «Проведение лабораторных микробиологических и иммунологических исследований» ГБПОУ Департамента здравоохранения г. Москвы «Медицинский колледж № 1»; ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия).

Петухова Ирина Николаевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). E-mail: irinapet@list.ru. SPIN-код: 1265-2875. AuthorID (РИНЦ): 710090. Author ID (Scopus): 6701329760.

Григорьевская Злата Валерьевна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). E-mail: zlatadoc@list.ru. SPIN-код: 4416-5191. AuthorID (РИНЦ): 710236. Author ID (Scopus): 57200538935.

Дмитриева Анна Игоревна, технолог-лаборант лаборатории микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии, ФГБУ «РОНЦ им. Блохина» (г. Москва, Россия). E-mail: dmitriewaanna@gmail.com.

Багирова Наталья Сергеевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). E-mail: nbagirova@mail.ru. SPIN-код: 1991-2017. AuthorID (РИНЦ): 266234. Author ID (Scopus): 6603332319.

Терещенко Инна Васильевна, научный сотрудник лаборатории микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). E-mail: in.ter68@inbox.ru. SPIN-код: 3185-9586. AuthorID (РИНЦ): 929834. Author ID (Scopus): 57193277015.

Хмаладзе Елена Николаевна, заместитель главного врача по санитарно-эпидемиологической работе, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). E-mail: e.hmaladze@ronc.ru.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект 17-15-01526).

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Natalia V. Dmitrieva, MD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Microbiological Diagnostics and Management of Infections in Cancer Patients, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (Moscow, Russia). E-mail: prof.ndmitrieva@mail.ru. Author ID (Scopus): 56338598600.

Viktoria V. Aginova, lecturer, Medical college №1 (Moscow, Russia).

Irina N. Petukhova, MD, DSc, Leading Research Scientist, Laboratory of Microbiological Diagnostics and Management of Infections in Cancer Patients, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (Moscow, Russia). E-mail: irinapet@list.ru. Author ID (Scopus): 6701329760.

Zlata V. Grigorievskaya, MD, DSc, Senior Researcher, Laboratory of Microbiological Diagnostics and Management of Infections in Cancer Patients, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (Moscow, Russia). E-mail: zlatadoc@list.ru. Author ID (Scopus): 57200538935.

Anna I. Dmitrieva, Laboratory Assistant, Microbiological Diagnostics and Management of Infections in Cancer Patients, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (Moscow, Russia). E-mail: dmitriewaanna@gmail.com.

Natalia S. Bagirova, MD, DSc, Leading Research Scientist, Laboratory of Microbiological Diagnostics and Management of Infections in Cancer Patients, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (Moscow, Russia). E-mail: nbagirova@mail.ru. Author ID (Scopus): 6603332319.

Inna V. Tereshchenko, Research Fellow, Laboratory of Microbiological Diagnostics and Management of Infections in Cancer Patients, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (Moscow, Russia). E-mail: in.ter68@inbox.ru. Author ID (Scopus): 57193277015.

Elena N. Khmaladze, Deputy Chief Physician, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (Moscow, Russia). E-mail: e.hmaladze@ronc.ru.

Funding

This work was supported by the Russian Science Foundation (project 17-15-01526).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-43-49
УДК: 616-006.81-091.811:615.155

Для цитирования: Боробова Е.А., Антонец Д.В., Старостина Е.В., Карпенко Л.И., Жеравин А.А., Ильичев А.А., Бажан С.И. Способность искусственных антигенных конструкций, содержащих эпитопы белков, ассоциированных с меланомой, стимулировать цитотоксическую активность мононуклеарных клеток периферической крови в отношении клеток меланомы. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 43–49. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-43-49.

For citation: Borobova E.A., Antonets D.V., Starostina E.V., Karpenko L.I., Zheravin A.A., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Ability of protein epitope-containing constructs associated with melanoma to stimulate the cytotoxic activity of peripheral blood mononuclear cells against melanoma cells. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 43–49. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-43-49.

СПОСОБНОСТЬ ИСКУССТВЕННЫХ АНТИГЕННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ЭПИТОПЫ БЕЛКОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МЕЛАНОМОЙ, СТИМУЛИРОВАТЬ ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ

Е.А. Боробова^{1,2}, Д.В. Антонец², Е.В. Старостина², Л.И. Карпенко², А.А. Жеравин¹,
А.А. Ильичев², С.И. Бажан²

Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина, г. Новосибирск, Россия¹
Россия, 630055, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15. E-mail: borobova-elena@rambler.ru¹

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область, Россия²
Россия, 630559, п. Кольцово, Новосибирская область²

Аннотация

Цель исследования – оценить способность ДНК-конструкций pMEL-TCI и pMEL-A0201, кодирующих искусственные полиэпитопные антигены меланомы, стимулировать противоопухолевый ответ в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*. **Материал и методы.** Изучение цитотоксической активности проводилось в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo* с использованием мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови HLA-A*02:01 позитивных доноров. Цитотоксическую активность оценивали двумя методами: 1) по способности МНК, стимулированных дендритными клетками, трансфицированными плазмидами pMEL-TCI и pMEL-A0201, вызывать лизис клеток меланомы человека линии Mel Is, а также 2) по уровню их гранзим-продуцирующей активности. В качестве положительного контроля использовалась рекомбинантная плазмида, кодирующая полноразмерный антиген клеток меланомы MART-1. **Результаты.** Полученные результаты показали, что дендритные клетки HLA-A*02:01+ доноров, трансфицированные плазмидными конструкциями pMel-A0201 и pMel-TCI, стимулировали цитотоксическую активность аутологических МНК в отношении клеток меланомы Mel Is. Как по эффективности индукции цитотоксического ответа, так и по уровню стимуляции продукции гранзима В аллелеспецифическая конструкция достоверно превзошла конструкцию, кодирующую полноразмерный белок MART1. **Заключение.** ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные полипептиды, составленные из эпитопов опухолевых антигенов, способны стимулировать противоопухолевый цитотоксический ответ. Данный подход может послужить основой для разработки новых способов иммунотерапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: меланома, ДНК-вакцинные конструкции, Т-клеточные эпитопы, полиэпитопные антигены, цитотоксические Т-лимфоциты, меланома кожи, иммуногены, цитотоксическая активность, иммунный ответ.

ABILITY OF PROTEIN EPITOPE-CONTAINING CONSTRUCTS ASSOCIATED WITH MELANOMA TO STIMULATE THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS AGAINST MELANOMA CELLS

E.A. Borobova^{1,2}, D.V. Antonets², E.V. Starostina², L.I. Karpenko², A.A. Zheravin¹, A.A. Ilyichev², S.I. Bazhan²

E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia¹

15, Rechkunovskaya Street, 630055-Novosibirsk, Russia. E-mail: borobova-elena@rambler.ru¹

Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk, Russia²

Koltsovo-630559, Novosibirsk Region, Russia²

Abstract

Aim. The aim of the study was to evaluate the ability of pMEL-TCI and pMEL-A0201 DNA-constructs encoding artificial polypeptide melanoma antigens to induce antitumor T cell immune response ex vivo. **Material and Methods.** Dendritic cells were obtained from peripheral blood mononuclear cells of HLA-A02:01-positive donors; DCs transfected with target DNA vaccine constructions were co-cultured with autologous T lymphocytes to stimulate anti-tumor effector T cells. Specific activity of ex vivo stimulated PBMC was assessed (1) by their ability to cause lysis of human melanoma Mel Is cells, and (2) by the level of their granzyme-producing activity. A recombinant plasmid encoding the full-length MART-1 melanoma antigen was used as a positive control. **Results.** All DNA vaccine constructions as well as positive control construction were found to be able to stimulate specific anti-tumor immune responses of autologous PBMC ex vivo, and these PBMC were found to induce melanoma Mel Is cells lysis. Both the efficiency of induced cytotoxic responses and the level of granzymes production stimulated with DCs transfected with pMel-A0201 significantly exceeded those stimulated with DCs transfected with either pMel-TCI or with DNA construction encoding the full-length MART-1 protein. The cytotoxicity level correlates with the level of granzyme B production in CD8+ T lymphocytes. **Conclusion.** DNA vaccine constructions encoding artificial polypeptides composed of tumor antigen epitopes can stimulate the antitumor cytotoxic response. This approach can be used as the basis for the development of new methods of immunotherapy for cancer.

Key words: melanoma, DNA-vaccine constructs, T-cell epitopes, artificial immunogens, cytotoxic T-lymphocytes, skin melanoma, immunogens, cytotoxic activity, immune response.

Введение

Меланома является наиболее опасным злокачественным новообразованием кожи [1]. В последнее десятилетие отмечается стремительный рост заболеваемости меланомой кожи (МК) по всему миру, при этом пока не существует универсального метода терапии этой опухоли. Стандартные методы лечения меланомы позволяют добиться определенных результатов, но не приводят к увеличению выживаемости больных. Высокая смертность и низкая эффективность лечения диктуют необходимость разработки новых методов лечения МК.

Известно, что клетки меланомы обладают высокой иммуногенностью. Описан ряд белковых антигенов, специфичных для меланомы и некоторых других форм злокачественных опухолей, отсутствующих (или практически отсутствующих) на нормальных клетках организма человека. Среди них можно выделить такие антигены, как Melan-A/MART-1, gp100, тирозиназа, MAGE-3 и NY-ESO-1 [2–4]. Это обстоятельство дает возможность разработки стратегии иммунотерапии меланомы, основанной на применении терапевтических вакцин, создаваемых с использованием достижений

современной иммунологии, биоинформатики и клеточных технологий. Весьма привлекательной в этом плане представляется ДНК-вакцинация, индуцирующая активацию цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов – главных эффекторных клеток противоопухолевого иммунного ответа [5].

Ранее с использованием программного обеспечения TEpredict и PolyCTLDesigner [6, 7] был проведен теоретический дизайн последовательностей двух искусственных Т-клеточных иммуногенов (MEL-A0201 и MEL-TCI), содержащих как цитотоксические (CD8+ CTL), так и хелперные (CD4+ Th) Т-клеточные эпитопы 6 меланомных антигенов (NY-ESO-1, MART1, MAGE-A1, MAGE-A11, MAGE-A3 и MAGE-C1) [8]. Иммуноген MEL-TCI содержит эпитопы, рестриктированные наиболее распространенными аллельными вариантами молекул HLA I класса, тогда как конструкция MEL-A0201 является аллель-специфической, в которую включены эпитопы, рестриктированные молекулами HLA-A*02:01. Искусственные гены, кодирующие целевые иммуногены, спроектированы с использованием программного обеспечения GeneDesigner [9]. Для увеличения экспрессии

целевых генов использовались кодоны высокоэкспрессируемых генов человека. Спроектированные гены были синтезированы (Evrogen LLC, Russia) и клонированы в составе плазмиды pcDNA3.1, являющейся эукариотическим экспрессионным вектором. В качестве положительного контроля использовалась рекомбинантная плазида, кодирующая полноразмерный антиген клеток меланомы MART1. Экспрессия целевых генов в составе ДНК-вакцинных конструкций была подтверждена с помощью трех методов: ОТ-ПЦР, иммуноблоттинга и внутриклеточного окрашивания продукта экспрессии специфическими моноклональными антителами (МКА) 29F2 к маркерному эпитопу белка р24 ВИЧ-1 [8].

Цель исследования заключалась в оценке способности искусственных полиэпитопных иммуногенов, сконструированных нами ранее, индуцировать противоопухолевый ответ в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*.

Материал и методы

Получение миелоидных дендритных клеток

Образцы крови здоровых доноров были получены в ФГБУ «НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина». Протокол исследования № 4 от 29.04.2016 был рассмотрен и одобрен на заседании этического комитета центра. Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МНК) HLA-A*02:01 позитивных доноров выделяли из лейкомазсы в градиенте плотности с использованием Lymphocyte separation medium (MP BIOMEDICALS, США). Клетки интерфазного кольца собирали, дважды отмывали, инкубировали в среде RPMI-1640 2 ч в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ при 37 °C. Прилипшую фракцию культивировали в 48-луночном планшете (Greiner bio-one, Германия) в концентрации 1 млн/мл, в объеме 0,5 мл полной среды RPMI-1640 в присутствии 100 нг/мл rhGM-CSF и 20 нг/мл rhIL-4 в течение 4 сут для получения незрелых дендритных клеток (ДК). Далее проводилась процедура магнитной трансфекции на стадии незрелых ДК согласно инструкции производителя (PromoKine, USA). Для индукции созревания к культуре трансфицированных ДК добавляли коктейль цитокинов: rhTNF-α (50 нг/мл), rIL-1β (20 мкг/мл), IFN γ (20 нг/мл), IFN α (20 нг/мл), ИЛ-1 β (25 нг/мл) и инкубировали в течение 24 ч. Для оценки фенотипа ДК были использованы соответствующие меченные флюорохромами моноклональные антитела anti-CD14-FITC, anti-CD83-PE, anti-CD86-PerCP-Cy5.5, anti-HLA-DR-FITC, anti-CD11C-PE с последующим анализом на проточном цитофлуориметре FACS CALIBUR (BD, США). Клетки в количестве 0,3×10⁶ инкубировали с антителами в течение

20 мин при комнатной температуре в темноте, затем отмывали PBS, содержащим 0,02 % ЭДТА и 1 % азида натрия, и фиксировали в растворе с 0,1 % параформальдегида. Уровень экспрессии маркеров на поверхности полученных ДК составил более 80 % для CD80/CD86/CD11c/CD80.

Стимуляция МНК в совместной культуре с ДК

Зрелые дендритные клетки, трансфицированные плазмидами pMEL-TCI, pMEL-A0201, pcDNA-MART1, pcDNA3.1, подвергались совместному культивированию с неприлипшей фракцией МНК в течение 48 ч (в соотношении ДК:МНК = 1:10) в среде RPMI-1640 с содержанием 10 % FBS при 37 °C, 5 % CO₂. Полученные активированные клетки использовались для оценки цитотоксической активности и уровня продукции гранзима В цитотоксическими Т-лимфоцитами.

Изучение гранзим-продуцирующей активности цитотоксических Т-лимфоцитов

Уровень гранзим-продуцирующей активности цитотоксических Т-лимфоцитов в совместной культуре МНК и ДК, трансфицированных целевыми плазмидами, оценивался с помощью метода проточной цитофлуориметрии. К суспензии МНК с дендритными клетками (2 сут культуре) в стерильных условиях добавляли по 1 мкл на 1×10⁶ клеток ингибитора транспорта белков BD GolgiStop согласно инструкции производителя набора Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD), инкубировали 4–6 ч в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C. Стимуляция МНК осуществлялась смесью синтетических пептидов, содержащих Т-клеточные эпитопы, входящие в состав целевых

Таблица

Синтетические пептиды, выбранные для стимуляции предшественников CTL в совместной культуре МНК и ДК, трансфицированных плазмидами pMEL-TCI, pMEL-A0201 и pcDNA-MART1

Пептиды		
pMEL-TCI	pMEL-A0201	pcDNA-MART1
EADPTGHSY	IMPKAGLLI	RRRNGYRAL
SVLEVFEGR	CILESLFRA	YRALMDKSL
YRAREPVTK	YIFATCLGL	ALMDKSLHV
YEDYFPEIF	FLWGPRLA	GYPKKGHH
EHSAYGEPR	LMWITQCFL	DKSLHVGTV
ESRLLEFYI	HLLLRKYRV	PAYEKLSAE
LTAADHRQL	ALMDKSLHV	GYRALMDKS
IRLTAADHR		RNGYRALMD
RRRNGYRAL		
HLLLRKYRV		
YRALMDKSL		
MPREDAHFI		
ALMDKSLHV		

полиэпигенных иммуногенов MEL-A0201 и MEL-TCI и белка MART-1 (таблица). Каждый пептид добавлялся в количестве 10 мкг/мл на 1×10^6 клеток.

В качестве контроля для оценки неспецифической стимуляции использовали форбол-12-мирикат-13-ацетат (PMA) (30 нг/мл) с иономицином (Io) (1 мкг/мл). Стимуляцию в этом случае проводили в течение 4–6 ч с добавлением BD GolgiStop. После инкубации клеток с ингибитором транспорта белков BD GolgiStop проводили окрашивание следующими моноклональными антителами: CD4/CD8/CD3/GR B (BD Biosciences, USA). Клетки с моноклональными антителами инкубировали 30 мин при 4 °С. Далее клетки промывали и проводили анализ уровня продукции гранзим В эффекторными Т-лимфоцитами на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur. Подсчет гранзим В продуцирующих CD8⁺ клеток проводился среди пула CD8⁺ клеток.

Оценка цитотоксической активности

Анализ цитотоксической активности аутологичных МНК, генерируемых в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*, проводился путем измерения содержания фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ), высвобождаемого из поврежденных клеток-мишеней, в качестве которых использовались опухолевые клетки меланомы линии Mel Is (Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, г. Москва). Измерения проводились согласно инструкции производителя набора CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega). В лунки 96-луночного планшета вносились клетки меланомы Mel Is в количестве 2×10^5 см². Клетки культивировались в среде RPMI-1640 с содержанием 10 % FBS при 37 °С в 5 % CO₂ в течение ночи. Через 16 ч в культуру опухолевых клеток вносили смесь ДК с аутологичными МНК. Соотношение эффекторных клеток и клеток мишеней составляло 10:1. Планшет с клетками инкубировался в течение 16–18 ч, после чего измеряли уровень ЛДГ в культуральной среде.

Статистический анализ

Статистическое сравнение результатов, полученных с использованием различных конструкций, проводили с помощью парного однонаправленного теста Стьюдента с поправкой на множественное тестирование по методу Бенжамини – Хохберга (FDR). Проверку гомоскедастичности проводили с помощью критерия Бартлетта. Во всех случаях критический уровень значимости был принят равным 5 % (0,05). Анализ результатов и построение графиков выполняли на персональном компьютере с использованием свободной программной среды для статистического анализа R [9]. Данные в тексте представлены в виде среднего и ошибки среднего.

Результаты

Исследование цитотоксической активности активированных эффекторных клеток по отношению к клеткам-мишеням

Поскольку основным механизмом элиминации опухолевых клеток является их непосредственный лизис, то мы провели исследование цитотоксической активности эффекторных клеток, сформированных в совместной культуре МНК и зрелых ДК, нагруженных плазмидами pMEL-TCI, pMEL-A0201, pcDNA-MART1, pcDNA3.1 [8]. В качестве мишени использовали клетки меланомы человека линии Mel Is, экспрессирующие на своей поверхности антиген MART-1. Оценка цитотоксической активности эффекторных клеток проводилась колориметрическим методом, позволяющим провести количественное определение содержания лактат-дегидрогеназы – цитозольного фермента, выделяющегося из лизированных клеток (см. раздел «Материал и методы»).

Результаты исследования цитотоксической активности МНК, стимулированной под влиянием различных иммуногенных конструкций, представлены на рис. 1. Статистический анализ полученных результатов показал, что цитотоксическая активность МНК, стимулированных дендритными клетками, трансфицированными конструкциями pcDNA-MART1 ($9,47 \pm 1,31$), pMel-TCI ($17,3 \pm 0,67$) и pMel-A0201 ($20,03 \pm 3,13$), значимо превосходит цитотоксический ответ, наблюдавшийся в совместной культуре МНК и ДК, трансфицированных векторной плазмидой pcDNA3.1 ($5,32 \pm 1,28$) ($p \leq 0,05$). Кроме того, цитотоксический ответ, индуцированный целевыми конструкциями pMel-A0201 и pMel-TCI, достоверно превосходил цитотоксический ответ, индуцированный плазмидой pcDNA-MART1, кодирующей полноразмерный белок MART-1 ($p = 0,035$). При этом различий между цитотоксическим ответом, индуцированным препаратами pMel-A0201 и pMel-TCI, не наблюдалось ($p = 0,26$).

Цитотоксические лимфоциты могут лизировать опухолевые клетки с помощью гранзима В, который является сериновой протеазой и накапливается в секреторных гранулах цитотоксических лимфоцитов и натуральных киллеров. Для подтверждения предположения о том, что лизис опухолевых клеток в нашем случае может осуществляться гранзимом В, мы определяли содержание клеток, экспрессирующих внутриклеточный гранзим В в культуре МНК здоровых доноров после совместного культивирования с ДК, трансфицированными препаратами целевых ДНК-вакцинных конструкций, по сравнению с совместными культурами МНК и ДК, трансфицированными контрольными плазмидами. Содержание клеток, имеющих в цитоплазме гранулы гранзима В, определяли с помощью метода внутриклеточного окрашивания цитокинов (ISC).

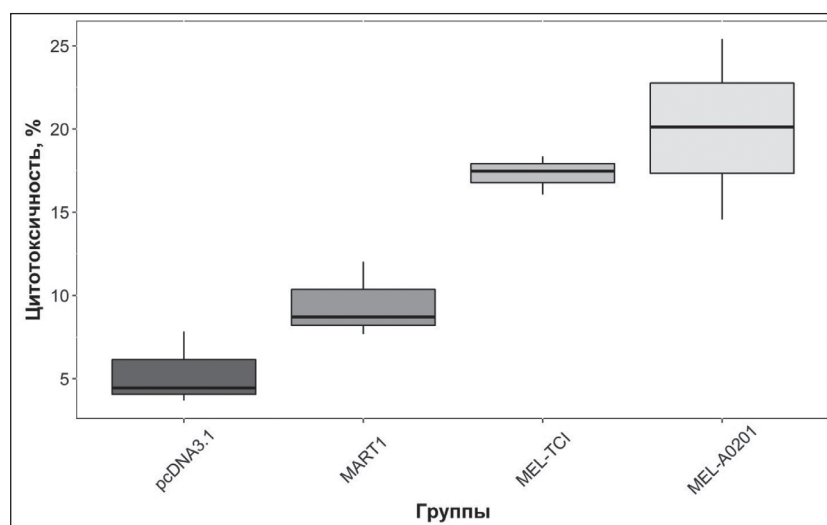


Рис. 1. Результаты исследования цитотоксического ответа МНК условно-здоровых доноров, стимулированного при совместном культивировании с аутологичными ДК, трансфицированными различными иммуногенными конструкциями, против линии клеток меланомы человека Mel Is (n=3).

Примечания: pcDNA3.1 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой; MART-1 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой pcDNA-MART1, кодирующей полноразмерный белок MART-1; Mel-A0201 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой pMel-A0201; Mel-TCl – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой pMel-TCl

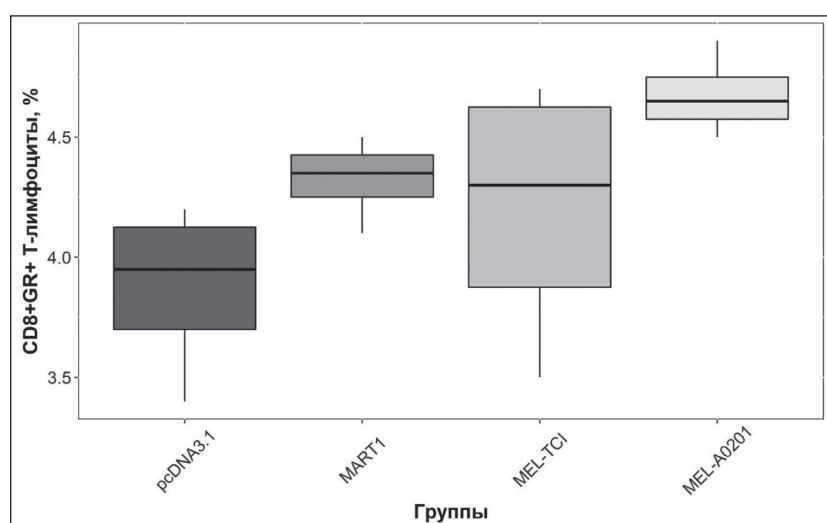


Рис. 2. Результаты исследования количества CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих гранзим В, в совместной культуре МНК условно-здоровых доноров с помощью метода ICS (n=4).

Примечания: pcDNA3.1 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных контрольной плазмидой; MART-1 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой pcDNA-MART1, кодирующей полноразмерный белок MART-1; Mel-A0201 – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой pMel-A0201; Mel-TCl – совместная культура МНК и ДК, трансфицированных плазмидой pMel-TCl

Результаты определения количества CD8+ клеток, продуцирующих гранзим В, полученные в опытных и контрольных образцах, представлены как процент от общего количества CD8+ лимфоцитов в пробе, значение которого оценивалось на основе анализа данных проточной цитометрии (рис. 2). Среди МНК, стимулированных препаратом pMel-A0201, обнаруживается в среднем 4,67 % ($\pm 0,09$) CD8+ гранзим-положительных CD8+ Т-лимфоцитов; среди МНК, культивированных с ДК, трансфицированными плазмидой pcDNA3,1 – 3,88 $\pm 0,18$; среди МНК, стимулиро-

ванных ДК, трансфицированными конструкцией pMel-TCl – 4,2 $\pm 0,28$; и 4,33 $\pm 0,09$ – среди МНК, стимулированных ДК, трансфицированными pcDNA-MART1. Статистический анализ результатов, представленных на рис. 2, показал, что в культурах МНК с ДК, трансфицированными pMel-A0201, относительное количество CD8+ гранзим-положительных CD8+ Т-лимфоцитов значимо превосходит результат, полученный в культурах МНК с ДК, трансфицированными pcDNA-MART1 и pcDNA3.1 ($p=0,018$). Отличия между остальными культурами были незначительными.

Обсуждение

Учитывая существующие в настоящее время проблемы в создании терапевтических вакцин против онкологических заболеваний, эта задача требует новых подходов. За последнее десятилетие был предложен ряд стратегий, учитывающих современные знания о противоопухолевом иммунитете. Один из подходов к созданию эффективных и безопасных вакцин нового поколения основан на дизайне мозаичных полиэпитопных антигенов на основе широкого спектра протективных В- и/или Т-клеточных детерминант [10–16]. В частности, данный подход включает создание искусственных полиэпитопных конструкций, оптимизированных для повышения эффективности процессинга и включающих большое количество консервативных Т-клеточных эпитопов, взаимодействующих с широким спектром аллельных вариантов молекул МНС. В данной работе исследовалась способность ранее созданных ДНК-вакцинных конструкций pMel-A0201 и pMel-TCl индуцировать противоопухолевый иммунный ответ, который оценивался по способности МНК вызывать лизис клеток меланомы Mel Is в системе индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*. Полученные результаты показали, что дендритные клетки HLA-A*02:01+ доноров, трансфицированные ДНК-вакцинными конструкциями pMel-A0201 и pMel-TCl, стимулировали у аутологичных МНК развитие цитотоксической активности в отношении клеток меланомы Mel Is. Причем как по эффективности индукции цитотоксического ответа, так и по уровню продукции гранзима В аллелеспецифическая конструкция достоверно превзошла ДНК-вакцинную конструкцию, кодирующую полноразмерный белок MART1.

Заключение

Исследование специфической активности ДНК-вакцинных конструкций pMel-A0201 и pMel-TCl, кодирующих искусственные полиэпитопные Т-клеточные антигены меланомы, позволяет сделать следующие выводы:

- цитотоксическая активность МНК, стимулированная ДК, трансфицированными ДНК-вакцинными конструкциями pMel-A0201 и pMel-TCl, достоверно превосходит цитотоксический ответ, индуцированный ДК, трансфицированными контрольными плазмидами pcDNA3.1 и pcDNA-MART1; различия между цитотоксическими ответами, индуцированными под влиянием конструкций pMel-A0210 и pMel-TCl, недостоверны;

- аллелеспецифическая конструкция MEL-A0201 обладает достоверно более выраженной способностью стимулировать продукцию гранзима В CD8+ Т-лимфоцитами в совместных культурах МНК+ДК, по сравнению с ДНК-конструкцией, кодирующей полноразмерный белок MART1 и векторной плазмидой pcDNA 3.1;

- полученные результаты свидетельствуют о том, что искусственные Т-клеточные антигены, спроектированные с использованием цитотоксических и хелперных эпитопов, отобранных из различных опухолевых антигенов меланомы, способны индуцировать иммунный ответ в отношении клеток МК. Данный подход может быть использован для разработки новых способов иммунотерапии не только меланомы, но и других злокачественных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer Statistics, 2018. CA Cancer J Clin. 2018 Jan; 68 (1): 7–30. doi: 10.3322/caac.21442.
2. Halama N., Zoernig I., Jaeger D. Advanced malignant melanoma: immunologic and multimodal therapeutic strategies. J Oncol. 2010; 2010: 689893. doi: 10.1155/2010/689893.
3. Pandolfi F., Cianci R., Lolli S., Dunn I.S., Newton E.E., Haggerty T.J., Boyle L.A., Kurnick J.T. Strategies to overcome obstacles to successful immunotherapy of melanoma. Int J Immunopathol Pharmacol. 2008 Jul-Sep; 21 (3): 493–500.
4. Parmiani G. Melanoma antigens and their recognition by T cells. Keio J Med. 2001 Jun; 50 (2): 86–90.
5. Denapoli P.M., Zanetti B.F., dos Santos A.A., de Moraes J.Z., Han S.W. Preventive DNA vaccination against CEA-expressing tumors with anti-idiotypic scFv6. C4 DNA in CEA-expressing transgenic mice. Cancer Immunol Immunother. 2017 Mar; 66 (3): 333–342. doi: 10.1007/s00262-016-1940-4.
6. Antonets D.V., Bazhan S.I. PolyCTLDesigner: a computational tool for constructing polyepitope T-cell antigens. BMC Res Notes. 2013 Oct 10; 6: 407. doi: 10.1186/1756-0500-6-407.
7. Antonets D., Maksyutov A. TEpredict: software for T-cell epitope prediction. Mol Biol (Mosk). 2010 Jan-Feb; 44 (1): 1309.
8. Борова Е.А., Антонетс Д.В., Старостина Е.В., Смирнова О.Ю., Щербakov Д.Н., Волкова О.Ю., Орешкова С.Ф., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Бажан С.И. Кандидаты ДНК-вакцины против меланомы: дизайн, конструирование и оценка экспрессии целевых генов в эукариотических клетках. Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: биология, клиническая медицина. 2012; 10 (5): 23–30. [Borova E.A., Antonets D.V., Starostina E.V., Smirnova O.Yu., Scherbakov D.N., Volkova O.Yu., Oreshkova S.F., Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Candidates of DNA vaccine against melanoma: design, engineering and estimating the expression of target genes in eu-

- karyotic cells. Vestnik NGU. Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina. 2012; 10 (5): 23–30. (in Russian)].

9. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing [Internet]. URL: <https://www.R-project.org>. (cited: 06.08.2018).

10. Villalobos A., Welch M., Minshall J. In silico design of functional DNA constructs. Methods Mol Biol. 2012; 852: 197–213. doi: 10.1007/978-1-61779-564-0_15.

11. Bazhan S.I., Belavin P.A., Seregin S.V., Danilyuk N.K., Babkina I.N., Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Lebedev L.R., Ignatyev G.M., Agafonov A.P., Poryvaeva V.A., Aborneva I.V., Ilyichev A.A. Designing and engineering of DNA-vaccine construction encoding multiple CTL-epitopes of major HIV-1 antigens. Vaccine. 2004 Apr 16; 22 (13–14): 1672–82. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.09.048.

12. Berzofsky J., Berkower I. Novel approaches to peptide and engineered protein vaccines for HIV using defined epitopes: advances in 1994/1995. AIDS. 1995; 9 Suppl A: S143–57.

13. Cardinaud S., Bouziat R., Rohrlach P.S., Tourdot S., Weiss L., Langlade-Demoyen P., Burgevin A., Fiorentino S., van Endert P., Lemonnier F.A. Design of a HIV-1-derived HLA-B07. 02-restricted polyepitope construct. AIDS. 2009 Sep 24; 23 (15): 1945–54. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832fae88.

14. Iglesias M.C., Mollier K., Beignon A.S., Souque P., Adotevi O., Lemonnier F., Charneau P. Lentiviral vectors encoding HIV-1 polyepitopes induce broad CTL responses in vivo. Molr Ther. 2007; 15 (6): 1203–10. doi: 10.1038/sj.mt.6300135.

15. Tine J.A., Firat H., Payne A., Russo G., Davis S.W., Tartaglia J., Lemonnier F.A., Demoyen P.L., Moingeon P. Enhanced multi-epitope-based vaccines elicit CD8+ cytotoxic T cells against both immunodominant and cryptic epitopes. Vaccine. 2005; 23 (8): 1085–91. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.01.001.

16. Woodberry T., Gardner J., Mateo L., Eisen D., Medveczky J., Ramshaw I.A., Thomson S.A., Ffrench R.A., Elliott S.L., Firat H., Lemonnier F.A., Suhrbier A. Immunogenicity of a human immunodeficiency virus

(HIV) polytope vaccine containing multiple HLA A2 HIV CD8+ cytotoxic T-cell epitopes. J Virol. 1999; 73 (7): 5320–5.

Поступила/Received 06.08.18
Принята в печать/Accepted 02.11.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Боробова Елена Александровна, врач клинической лабораторной диагностики, НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина (г. Новосибирск, Россия); младший научный сотрудник отдела биоинженерии, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). E-mail: borobova-elena@rambler.ru. SPIN-код: 8705-3124.

Антонен Денис Викторович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник теоретического отдела, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). SPIN-код: 6825-8804.

Старостина Екатерина Владимировна, младший научный сотрудник отдела биоинженерии, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). E-mail: starostina_ev@vector.nsc.ru. SPIN-код: 5551-1523.

Карпенко Лариса Ивановна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). E-mail: karpenko@vector.nsc.ru. SPIN-код: 2026-5992.

Жеравин Александр Александрович, кандидат медицинских наук, руководитель центра онкологии и радиотерапии, НМИЦ им. Е.Н. Мешалкина (г. Новосибирск, Россия). E-mail: a_zheravin@meshalkin.ru. SPIN-код: 2858-7175.

Ильичев Александр Алексеевич, доктор биологических наук, заведующий отделом биоинженерии, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). E-mail: ilyichev@vector.nsc.ru. SPIN-код: 7401-7013.

Бажан Сергей Иванович, доктор биологических наук, заведующий теоретическим отделом, ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирская обл., рп. Кольцово, Россия). E-mail: bazhan@vector.nsc.ru. SPIN-код: 6934-4489.

Финансирование

Работа проводилась в рамках темы «Доклинические исследования ДНК-вакцины против меланомы» Государственного контракта от 13 ноября 2015 г. № 14.N08.12.0067 ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Elena A. Borobova, Reseracher, E.N. Meshalkin National Medical Research Center (Novosibirsk, Russia); State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: borobova_ea@vector.nsc.ru.

Denis V. Antonets, PhD, Senior Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: antonets@yandex.ru.

Ekaterina V. Starostina, Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: starostina_ev@vector.nsc.ru.

Larisa I. Karpenko, PhD, Head of the Laboratory of recombinant vaccines in Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: karpenko@vector.nsc.ru.

Alexander A. Zheravin, MD, PhD, Head of Oncology and Radiotherapy Department, E.N. Meshalkin National Medical Research Center (Novosibirsk, Russia). E-mail: a_zheravin@meshalkin.ru.

Alexander A. Ilyichev, PhD, Head of the Department of Bioengineering, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: ilyichev@vector.nsc.ru.

Sergei I. Bazhan, PhD, Head of the Theoretical Department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» (Koltsovo, Novosibirsk region, Russia). E-mail: bazhan@vector.nsc.ru.

Funding

This study was supported by Government contract 16.512.11.2186 of Federal target program «Research and development for priority directions of science and technology complex of Russia».

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Для цитирования: Власова О.А., Борунова А.А., Сафина А., Сметанина И.В., Лесовая Е.А., Белицкий Г.А., Заботина Т.Н., Гурова К., Кирсанов К.И., Якубовская М.Г. Активация сигнального пути интерферона-альфа ресвератролом, генистеином и кверцетином. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 50–55. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-50–55.

For citation: Vlasova O.A., Borunova A.A., Safina A., Smetanina I.V., Lesovaya E.A., Belitsky G.A., Zabolina T.N., Gurova K., Kirsanov K.I., Yakubovskaya M.G. Activation of interferon- α signaling by resveratrol, genistein and quercetin. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 50–55. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-50-55.

АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ ИНТЕРФЕРОНА-АЛЬФА РЕСВЕРАТРОЛОМ, ГЕНИСТЕИНОМ И КВЕРЦЕТИНОМ

**О.А. Власова¹, А.А. Борунова¹, А. Сафина², И.В. Сметанина¹,
Е.А. Лесовая^{1,3}, Г.А. Белицкий¹, Т.Н. Заботина¹, К. Гурова²,
К.И. Кирсанов^{1,4}, М.Г. Якубовская¹**

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва, Россия¹

Россия, г. Москва, 115478, Каширское шоссе, 24. E-mail: olya_vlasov@mail.ru¹

Онкологический центр Розвел Парк, Баффало, США²

США, Баффало, 14263, ул. Элм Картон. E-mail: alfiya.safina@roswellpark.org²

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Рязань, Россия³

Россия, г. Рязань, 390026, ул. Высоковольная, 9. E-mail: lesovenok@yandex.ru³

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Россия⁴

Россия, г. Москва, 117198, ул. Миклухо-Маклая, 6. E-mail: kkirsanov85@yandex.ru⁴

Аннотация

Ресвератрол, кверцетин и генистеин, относящиеся к полифенолам вторичных метаболитов растений, обладают антиканцерогенным и противовирусным эффектами, реализуемыми в результате их плейотропного действия на различные макромолекулы клетки. Эти соединения могут взаимодействовать с ДНК, не образуя ковалентные связи. При этом может происходить изменение пространственных, физико-химических и структурных характеристик ДНК, что может приводить к нарушению функционирования белков метаболизма ДНК и вызывать дестабилизацию хроматина. Такие эффекты были описаны для нового противоопухолевого препарата Кураксина CBL0137, причем индуцированная данным соединением дестабилизация хроматина приводила к активации сигнального пути интерферона- α . Используя клеточную линию HeLa с трансгенным флуоресцентным белком mCherry, содержащим в промоторной области консенсусный сайт связывания интерферона- α (ISRE), мы продемонстрировали дозозависимый стимулирующий эффект ресвератрола, кверцетина и генистеина на активность сигнального пути интерферона- α . Использование прижизненной флуоресцентной микроскопии на клеточной линии HT1080 с трансгенным флуоресцентно-меченным гистон H1.5 позволило продемонстрировать, что данные полифенолы вызывают перераспределение данного линкерного гистона в ядрах клеток. Полученные нами данные свидетельствуют о возможности существования ДНК-зависимого механизма реализации противоопухолевого действия растительных полифенолов и необходимости дальнейшего изучения влияния полифенолов на структуру хроматина и связанного с этим изменения функционирования генома, в частности регуляции сигнального пути интерферона- α .

Ключевые слова: растительные полифенолы, ресвератрол, генистеин, кверцетин, интерферон- α , гистон H1, макромолекулы клетки, флуоресцентная микроскопия, ферменты метаболизма.

ACTIVATION OF INTERFERON- α SIGNALING BY RESVERATROL, GENISTEIN AND QUERCETIN

O.A. Vlasova¹, A.A. Borunova¹, A. Safina², I.V. Smetanina¹, E.A. Lesovaya^{1,3},
G.A. Belitsky¹, T.N. Zabortina¹, K. Gurova², K.I. Kirsanov^{1,4}, M.G. Yakubovskaya¹

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia¹

24, Kashirskoe shosse, 115478-Moscow, Russia. E-mail: olya_vlasov@mail.ru¹

Roswell Park Cancer Center, Buffalo, NY, USA²

Elm Carlton Street, 14263-Buffalo, NY, USA. E-mail: alfiya.safina@roswellpark.org²

I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia³

9, Vysokovol'tnaya Street, 390026-Ryazan, Russia. E-mail: lesovenok@yandex.ru³

RUDN University, Moscow, Russia⁴

6, Miklukho-Maklaya Street, 117198-Moscow, Russia. E-mail: kkirsanov85@yandex.ru⁴

Abstract

Resveratrol, genistein and quercetin from the group of polyphenols from secondary plant metabolites reveal cancer preventive and antivirus effects realized via their pleiotropic influence on the different macromolecules in cells. These compounds can interact with DNA without the formation of covalent bonds. This process is usually followed by changes in spatial, physical-chemical and structural DNA characteristics that can result in disfunction of DNA metabolism enzymes and chromatin destabilization. Similar effects were described for anticancer drug Curaxine CBL0137 in association with activation of interferon- α signaling. We demonstrated dose-dependent stimulating effects of resveratrol, genistein and quercetin on interferon- α signaling using HeLa cells expressed mCherry protein with interferon-stimulated response elements (ISRE) in promoter. Furthermore, it was shown by live-cell fluorescent microscopy in HT1080 cells with mCherry-labeled histone H1.5 that described polyphenols induced the redistribution of this linker histone in cell nuclei. The data obtained suggest an existence of DNA-dependent mechanism of anticancer effects of plant polyphenols and a need for further study of crosslinks between the polyphenols' influence on chromatin structure and the changes in genome function, in particular, induction of interferon- α signaling.

Key words: plant polyphenols, resveratrol, genistein, quercetin, interferon- α , histone H1, macromolecules, fluorescence microscopy, metabolism enzymes.

Введение

Анализу биологических эффектов ресвератрола, кверцетина и генистеина, вторичных метаболитов растений из группы полифенолов, посвящены многочисленные исследования [1–3]. В экспериментах на грызунах эти соединения эффективно снижают частоту возникновения и множественность опухолей толстой кишки, индуцированных 1,2-диметилгидразином или азоксиметаном, опухолей яичников, индуцированных 7,12-диметилбенз(а)антраценом, и опухолей молочных желез, индуцированных 7,12-диметилбенз(а)антраценом и N-метил-N-нитрозомочевинной, и др. [4–7]. Ресвератрол, кверцетин и генистеин обладают антипролиферативным, проапоптотическим, противовоспалительным и иммуномодулирующим эффектами [1, 2, 8, 9]. При этом для их действия в клетках млекопитающих характерна плеiotропность. В частности, ресвератрол имеет более 20 молекулярных мишеней, включая клеточные рецепторы, ферменты метаболизма гидрофобных ксенобиотиков, компоненты ряда сигнальных путей, транскрипционные факторы, ферменты метаболизма ДНК и системы эпигенетической регуляции транскрипции [1, 4, 10]. Аналогичные данные о существовании целого ряда молеку-

лярных мишеней были продемонстрированы для генистеина и кверцетина [11, 12]. Плеiotропность эффектов изучаемых полифенолов делает исключительно сложной интерпретацию интегрального результата их воздействия на клетку, которая становится невозможной без использования соответствующих баз данных [1]. Кроме того, ресвератрол, кверцетин и генистеин представляют собой ДНК-тропные соединения, способность которых к интеркаляции показана тушением флуоресценции в системе ДНК-EtBr [13–15].

Эти данные, в сопоставлении с результатами исследований по влиянию интеркаляторов ДНК и УБЛ на структуру и свойства дуплекса [16], позволяют считать, что изучаемые нами полифенолы, взаимодействуя с ДНК, могут влиять на геометрические характеристики и термодинамическую стабильность дуплекса, гибкость и физико-химические свойства биополимера, а также вероятность формирования и стабилизации различных альтернативных структур ДНК, таких как G-квадруплексы, H-ДНК и круциформы. Кроме того, эти соединения могут экранировать определенные позиции по малой и большой бороздкам ДНК, конкурентно ингибируя работу ферментов «домашнего хозяйства». Всё это может влиять

на процессы компактизации ДНК и трехмерную организацию эукариотического генома.

В настоящее время эффекты дестабилизации хроматина ДНК-тропными агентами были описаны лишь для нового противоопухолевого препарата CBL0137 [17, 18] и ряда узкобороздочных лигандов (УБЛ) [19]. Причем при действии как CBL0137, так и УБЛ наблюдалось повышение уровня экспрессии ретротранспозонов и других повторяющихся последовательностей ДНК. Это, в свою очередь, должно приводить к активации сигнального пути интерферона- α , как это было показано для CBL0137 [17]. Для изучения этих эффектов CBL0137 были получены модельные системы, позволяющие оценить запуск сигнального пути интерферона- α с помощью репортерного анализа и изменения локализации гистона H1 методом прижизненной флуоресцентной микроскопии. При изучении эффектов CBL0137 активность сигнального пути интерферона- α оценивали в клетках HeLa по уровню экспрессии трансгенного флуоресцентного белка mCherry, имеющего в промоторной области консенсусный сайт связывания интерферона- α (ISRE). Анализ локализации гистона H1 в ядрах обработанных клеток проводили на линии HT1080 с трансгенным гистоном H1.5, флуоресцентно меченным mCherry [17, 18]. При этом активация сигнального пути интерферона- α наблюдалась при тех же концентрациях CBL0137, которые вызывали изменение локализации гистона H1 в ядрах обработанных клеток. Эти данные согласуются с результатами исследования функций гистона H1, демонстрирующими, что снижение содержания ряда изоформ H1 в хроматин-связанной фракции приводит к запуску экспрессии ретротранспозонов, а затем интерферон-зависимых генов [20]. Используя модельные системы, разработанные для анализа эффектов CBL0137 на интерфероновый сигналинг I типа и локализацию гистона H1, можно оценить наличие и ассоциацию аналогичных эффектов растительных полифенолов, выявление которых будет свидетельствовать о целесообразности изучения механизмов действия этих соединений, связанных с нарушениями процессов компактизации ДНК и пространственной структуры хроматина.

Цель исследования – анализ влияния растительных полифенолов ресвератрола, кверцетина и генистеина на запуск сигнального пути интерферона- α и локализацию гистона H1.

Материал и методы

Клеточные линии. В работе использованы следующие клеточные линии: HT1080 (ATCC), HT1080-H1-mCherry, HeLa-TI-ISRE-mCherry. Последние две линии были получены в лаборатории К. Гуровой, как это было описано ранее [17]. Клетки культивировали в стандартных условиях (+37 °C, 5 % CO₂) в культуральной среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, двойная модификация среды Игла) с добавлением эмбрио-

нальной телячьей сыворотки (10 %), L-глутамина и смеси антибиотиков пенициллина-стрептомицина (откуда реактивы).

ДНК-тропные соединения

В работе использовались следующие растительные полифенолы: ресвератрол (Selleck Chemical LLC), кверцетин (Sigma Aldrich), генистеин (Sigma Aldrich).

Прижизненная клеточная микроскопия

Для данного исследования была использована клеточная линия HT1080 H1-mCherry. Клетки культивировали в 48-луночных планшетах с прозрачным дном (Mat-Tek Corporation (Ashland, MA, USA)). Оценку влияния растительных полифенолов на состав клеточной популяции в зависимости от локализации гистона H1.5 в ядрах клеток проводили через 24 ч после обработки с помощью инвертированного микроскопа Zeiss Axio Observer A1 с иммерсионным объективом NACHROPLAN 100 $\times$ /1.25 и камерой Zeiss MRC5 с программным обеспечением AxioVision Rel.4.8. В некоторых случаях перед анализом флуоресценции клетки фиксировались в 4 % параформальдегиде в течение 10 мин.

Проточная цитофлуориметрия

Клетки линии HeLa TI ISRE-mCherry инкубировали с ДНК-тропными соединениями в течение 48 ч в стандартных условиях, затем снимали с подложки с помощью растворов Версена и Трипсина, центрифугировали 4 мин при 1100 об/мин и промывали осадок в однократном буфере PBS. Анализ распределения клеточной популяции по уровню флуоресценции проводили на проточном цитометре BD LSRII UV A Cytometers (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Полученные данные анализировали с помощью программы WinList 3D (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

Статистическая обработка данных

Все эксперименты выполнены в трех биологических повторах с анализом триплета проб в каждом из них. Средние значения и среднеквадратичные отклонения рассчитывали с помощью пакета программ Microsoft Excel. Для определения статистической значимости выявленных различий использовали парный двухвыборочный t-тест Стьюдента для средних.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования была определена цитотоксичность ресвератрола, генистеина и кверцетина на клетки линий HeLa с ISRE-mCherry и H1080 H1.5-mCherry с помощью МТТ-теста. Максимальные нетоксичные дозы при обработке клеток HeLa с ISRE-mCherry в течение 48 ч составили для ресвератрола и кверцетина 100 мкМ и 61 мкМ соответственно, а для генистеина IC₂₀ – 111 мкМ. В связи с этим в качестве максимальных

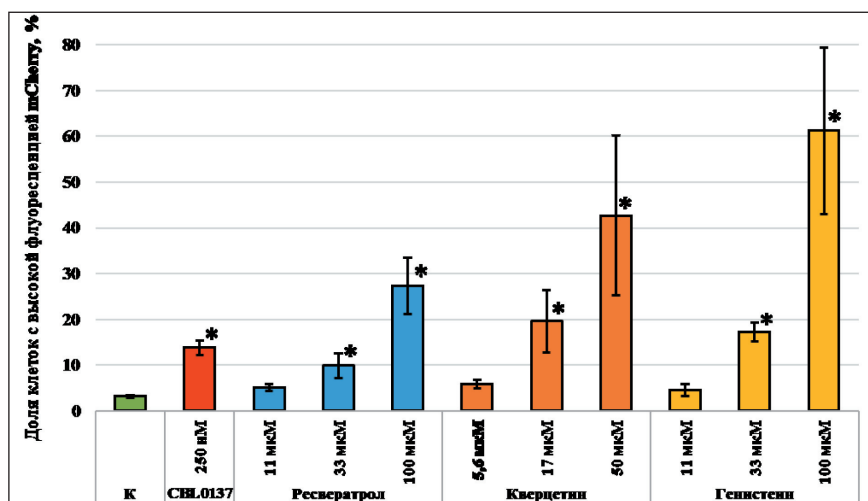


Рис. 1. Влияние ДНК-тропных фитонутриентов на экспрессию mCherry, находящегося под контролем ISRE.

Примечание: * – доля клеток с высокой флуоресценцией mCherry, статистически значимо превышающей контрольный уровень ($p < 0,05$)

концентраций соединений при анализе их эффектов на активацию сигнального пути интерферона- α использовали 100 мкМ для ресвератрола и генистеина и 50 мкМ для кверцетина.

Активацию сигнального пути интерферона- α оценивали методом проточной цитофлуориметрии, учитывая экспрессию репортерного гена mCherry с ISRE в промоторной области через 48 ч после добавления в среду культивирования клеток анализируемого соединения. В качестве позитивного контроля использовали обработку клеток CBL0137 в дозе 0,25 мкМ. При обработке клеток HeLa-ISRE-mCherry ресвератролом в нетоксичных концентрациях 33 и 100 мкМ через 48 ч наблюдалось увеличение активности сигнального пути интерферона- α в 3,3 и 9,0 раз соответственно (рис. 1).

При действии наименьшей концентрации ресвератрола (11 мкМ) увеличение доли клеток с флуоресценцией mCherry, превышающей контрольный уровень, составило 1,6 раза, однако это изменение не было статистически значимым.

Действие генистеина и кверцетина в концентрациях 11 мкМ и 5,6 мкМ соответственно также

не вызвало статистически значимого увеличения активности сигнального пути интерферона- α , однако имелась тенденция к увеличению доли клеток с высокой флуоресценцией mCherry (в 1,4 и 1,7 раза). При использовании генистеина в нетоксичных концентрациях (33 мкМ и 100 мкМ) наблюдалось увеличение доли клеток с высокой флуоресценцией mCherry – в 6,1 и 20,1 раза соответственно. Обработка клеток кверцетином в нетоксичной дозе 33 мкМ вызывала увеличение активности сигнального пути интерферона- α в 5,9 раза, а при действии 50 мкМ (IC20) – в 14,1 раза.

Таким образом, при обработке клеток HeLa-ISRE-mCherry изучаемыми полифенолами растений наблюдали дозозависимый эффект на уровень активности сигнального пути интерферона- α .

Далее с помощью метода прижизненной флуоресцентной микроскопии оценивали влияние растительных полифенолов на состав клеточной популяции в зависимости от локализации гистона H1.5 в ядрах клеток через 24 ч после обработки клеток соединениями в концентрациях, соответствующих IC50 при 48-часовой обработке (рис. 2).

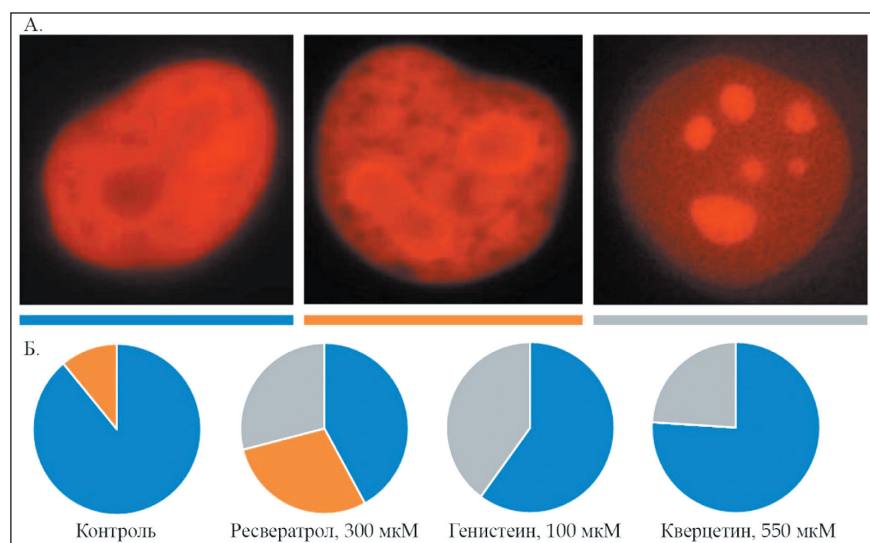


Рис. 2. Влияние ДНК-тропных соединений на локализацию гистона H1 через 24 ч после обработки клеток (синий – гистон H1.5 локализован с хроматином, оранжевый – промежуточный тип, серый – гистон H1.5 преимущественно локализован в ядрышках);

А – метод прижизненной микроскопии клеток с флуоресцентно-меченным белком H1 (клеточная линия HT1080-H1-mCherry); Б – распределение ядер по типу локализации гистона H1.5

В образцах, не обработанных ДНК-тропоными соединениями, гистон H1.5 был колокализован с хроматином в 89 % ядер, промежуточный тип, при котором гистон частично находился в ядрышках, наблюдался в 11 % ядер, при этом ядер с ядрышковой локализацией гистонового белка H1 (3-й тип) обнаружено не было. Наибольшие изменения в локализации гистона H1.5 вызвал ресвератрол в концентрации 333 мкМ: доля ядер с промежуточным типом увеличилась до 29 %, при этом ещё в 29 % клеток наблюдалась ядрышковая локализация гистонового белка. При обработке клеток двумя другими агентами ядра с промежуточным типом локализации гистонового белка отсутствовали, в то же время доля клеток с интенсивным накоплением гистона H1 в ядрышках для генистеина составила 40 %, для кверцетина – 24 %. Таким образом, изучаемые нами растительные полифенолы вызывали достаточно интенсивное изменение локализации гистона H1.5 в ядрах клеток через 24 ч после начала обработки, что позволяет сделать вывод о наличии слабого хроматин-дестабилизирующего эффекта у изученных соединений.

Наши данные об активации сигнального пути интерферона- α ресвератролом и кверцетином согласуются с результатами исследований об активации этими соединениями экспрессии гена

транскрипционного фактора STAT1 и фосфорилирования этого белка [21, 22], поскольку известно, что интерферон- α реализует свой противовирусный и антипролиферативный эффект путем активации JAK-тирозин-киназ, фосфорилирующих STAT-факторы [23]. Однако в исследованиях Igbe et al. [22] также продемонстрирована ассоциация данного эффекта с ингибированием тирозин-фосфатазы SHP2, которая негативно регулирует STAT1 путем его фосфорилирования, что, возможно, является еще одним примером плейотропности действия растительных полифенолов.

Заключение

Полученные нами данные о наличии эффектов ресвератрола, генистеина и кверцетина на сигнальный путь интерферона- α и дестабилизирующего влияния изучаемых соединений на хроматин, оцениваемого по влиянию на локализацию гистона H1.5, свидетельствуют о возможности существования ДНК-зависимого механизма реализации противоопухолевого действия растительных полифенолов и необходимости дальнейшего изучения взаимосвязи влияния полифенолов на структуру хроматина и связанного с этим изменения активности определенных сигнальных путей, в частности запуск сигнального пути интерферона- α .

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Pezzuto J.M. Resveratrol: Twenty Years of Growth, Development and Controversy. *Biomol Ther* (Seoul). 2018 Oct 11. doi: 10.4062/biomolther.2018.176.
2. Russo M., Russo G.L., Daglia M., Kasi P.D., Ravi S., Nabavi S.F., Nabavi S.M. Understanding genistein in cancer: The «good» and the «bad» effects: A review. *Food Chem*. 2016 Apr 1; 196: 589–600. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.085.
3. Rauf A., Imran M., Khan I.A., Ur-Rehman M., Gilani S.A., Mehmood Z., Mubarak M.S. Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. *Phytother Res*. 2018 Nov; 32 (11): 2109–2130. doi: 10.1002/ptr.6155.
4. Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009 May; 2 (5): 409–18. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-08-0160.
5. Whitsett T.G.Jr., Lamartiniere C.A. Genistein and resveratrol: mammary cancer chemoprevention and mechanisms of action in the rat. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006; 6 (12): 1699–706. doi: 10.1586/14737140.6.12.1699.
6. Barnes S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr*. 1995 Mar; 125 (3 Suppl): 777S783S. doi: 10.1093/jn/125.3_Suppl.777S.
7. Kiskova T., Ekmekcioglu C., Garajova M., Orendas P., Bojkova B., Bobrov N., Jager W., Kassayova M., Thalhammer T. A combination of resveratrol and melatonin exerts chemopreventive effects in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev*. 2012 Mar; 21 (2): 163–70. doi: 10.1097/CEJ.0b013e32834c9c0f.
8. Fantini M., Benvenuto M., Masuelli L., Frajese G.V., Tresoldi I., Modesti A., Bei R. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. *Int J Mol Sci*. 2015 Apr 24; 16 (5): 9236–82. doi: 10.3390/ijms16059236.
9. Jantan I., Ahmad W., Bukhari S.N. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Front Plant Sci*. 2015 Aug 25; 6: 655. doi: 10.3389/fpls.2015.00655.
10. Britton R.G., Kovoov C., Brown K. Direct molecular targets of resveratrol: identifying key interactions to unlock complex mechanisms. *Ann NY Acad Sci*. 2015 Aug; 1348 (1): 124–33. doi: 10.1111/nyas.12796.
11. Nagaraju G.P., Zafar S.F., El-Rayes B.F. Pleiotropic effects of genistein in metabolic, inflammatory, and malignant diseases. *Nutr Rev*. 2013 Aug; 71 (8): 562–72. doi: 10.1111/nure.12044.
12. Chirumbolo S. Quercetin in cancer prevention and therapy. *Integr Cancer Ther*. 2013 Mar; 12 (2): 97–102. doi: 10.1177/1534735412448215.

13. Kanakis C.D., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Diamantoglou S., Tajmir-Riahi H.A. DNA interaction with naturally occurring antioxidant flavonoids quercetin, kaempferol, and delphinidin. *J Biomol Struct Dyn*. 2005; 22 (6): 719–24. doi: 10.1080/07391102.2005.10507038.
14. Zhang S., Sun X., Jing Z., Qu F. Spectroscopic analysis on the resveratrol-DNA binding interactions at physiological pH. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2011 Nov; 82 (1): 213–6. doi: 10.1016/j.saa.2011.07.037.
15. Li H., Yu Y.Y., Hu X., Cao S.W. Research on the interactions between genistein and its glucosides with DNA. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*. 2008 Aug; 28 (8): 1905–9.
16. Lippert J., Klijnhout S., Dekker N.H. Torsional sensing of small-molecule binding using magnetic tweezers. *Nucleic Acids Res*. 2010 Nov; 38 (20): 7122–32. doi: 10.1093/nar/gkq598.
17. Leonova K., Safina A., Neshler E., Sandlesh P., Pratt R., Burkhart C., Lipchick B., Gitlin I., Frangou C., Koman I., Wang J., Kirsanov K., Yakubovskaya M.G., Gudkov A.V., Gurova K. TRAIN (Transcription of Repeats Activates Interferon) in response to chromatin destabilization induced by small molecules in mammalian cells. *Elife*. 2018 Feb 5; 7. pii: e30842. doi: 10.7554/eLife.30842.
18. Safina A., Cheney P., Pal M., Brodsky L., Ivanov A., Kirsanov K., Lesovaya E., Naberezhnov D., Neshler E., Koman I., Wang D., Wang J., Yakubovskaya M., Winkler D., Gurova K. FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res*. 2017 Feb 28; 45 (4): 1925–45. doi: 10.1093/nar/gkw1366.
19. Kirsanov K.I., Kotova E., Makhov P., Golovine K., Lesovaya E.A., Kolenko V.M., Yakubovskaya M.G., Tulin A.V. Minor groove binding ligands disrupt PARP-1 activation pathways. *Oncotarget*. 2014; 5 (2): 428–37. doi: 10.18632/oncotarget.1742.
20. Izquierdo-Bouldstridge A., Bustillos A., Bonet-Costa C., Aribau-Miralbes P., Garcia-Gomis D., Dabad M., Esteve-Codina A., Pascual-Reguant L., Peiro S., Esteller M., Murtha M., Millan-Arino L., Jordan A. Histone H1 depletion triggers an interferon response in cancer cells via activation of heterochromatic repeats. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45 (20): 11622–42. doi: 10.1093/nar/gkx746.
21. Yang Z., Meng Q., Zhao Y., Han R., Huang S., Li M., Wu X., Cai W., Wang H. Resveratrol Promoted Interferon- α -Induced Growth Inhibition and Apoptosis of SMMC7721 Cells by Activating the SIRT/STAT1. *J Interferon Cytokine Res*. 2018 Jun; 38 (6): 261–271. doi: 10.1089/jir.2017.0130.
22. Igbe I., Shen X.F., Jiao W., Qiang Z., Deng T., Li S., Liu W.L., Liu H.W., Zhang G.L., Wang F. Dietary quercetin potentiates the anti-proliferative effect of interferon- α in hepatocellular carcinoma cells

through activation of JAK/STAT pathway signaling by inhibition of SHP2 phosphatase. *Oncotarget*. 2017 Nov 20; 8 (69): 113734–748. doi: 10.18632/oncotarget.22556.

23. Zhao L.J., He S.F., Liu Y., Zhao P., Bian Z.Q., Qi Z.T. Inhibition of STAT Pathway Impairs Anti-Hepatitis C Virus Effect of Interferon Alpha. *Cell Physiol Biochem*. 2016; 40 (1–2): 77–90. doi: 10.1159/000452526.

Поступила/Received 9.11.18
Принята в печать/Accepted 23.11.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Власова Ольга Александровна, младший научный сотрудник отдела химического канцерогенеза, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва, Россия). E-mail: olya_vlasov@mail.ru.

Борунова Анна Анатольевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии опухолей, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва, Россия). E-mail: borunova_a@yandex.ru.

Сафина Альфия, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологии клеточного стресса онкологического центра Розвел Парк (Баффало, США). E-mail: alfiya.safina@roswellpark.org.

Сметанина Инна Васильевна, лаборант-исследователь отдела химического канцерогенеза, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва, Россия). E-mail: innasmet@yandex.ru.

Лесовая Екатерина Андреевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела химического канцерогенеза, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва, Россия). E-mail: lesovenok@yandex.ru. SPIN-код: 7593-2167. Researcher ID (WOS): J-7790-2015. Author ID (Scopus): 583044. ORCID: 0000-0002-1967-9637.

Белицкий Геннадий Альтерович, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела химического канцерогенеза, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва, Россия). E-mail: belitsga@mail.ru. SPIN-код: 4037-0033. Researcher ID (WOS): L-3062-2015. Author ID (Scopus): 107231.

Заботина Татьяна Николаевна, доктор биологических наук, заведующая централизованным клинико-лабораторным отделом, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва, Россия). E-mail: tatzabotina@yandex.ru.

Гурова Катерина, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией биологии клеточного стресса онкологического центра Розвел Парк (Баффало, США). E-mail: katerina.gurova@roswellpark.org.

Кирсанов Кирилл Игоревич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией канцерогенных веществ отдела химического канцерогенеза, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва, Россия). E-mail: kkirsanov85@yandex.ru. SPIN-код: 7329-7263. Researcher ID (WOS): L-3062-2015. Author ID (Scopus): 184421. ORCID: 0000-0002-8599-6833.

Якубовская Марианна Геннадиевна, доктор медицинских наук, заведующая отделом химического канцерогенеза, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (г. Москва, Россия). E-mail: mgyakubovskaya@mail.ru. SPIN-код: 6858-3880. Researcher ID (WOS): R-6984-2016. Author ID (Scopus): 583045. ORCID: 0000-0002-9710-8178.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект 17-15-01526).

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Olga A. Vlasova, Junior Researcher, Department of Chemical Carcinogenesis, N.N. Blokhin NMRCO (Moscow, Russia). E-mail: olya_vlasov@mail.ru.

Anna A. Borunova, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Tumor Immunology, N.N. Blokhin NMRCO (Moscow, Russia). E-mail: borunova_a@yandex.ru

Alfiya Safina, PhD, Research Fellow, Laboratory of Cell Stress Biology, Roswell Park Cancer Center (Moscow, Russia). E-mail: alfiya.safina@roswellpark.org.

Inna V. Smetanina, Laboratory Assistant, Department of Chemical Carcinogenesis, N.N. Blokhin NMRCO (Moscow, Russia). E-mail: innasmet@yandex.ru.

Ekaterina A. Lesovaya, PhD, Senior Researcher, Department of Chemical Carcinogenesis, N.N. Blokhin NMRCO (Moscow, Russia). E-mail: lesovenok@yandex.ru.

Gennady A. Belitsky, MD, PhD, DSc, Professor, Leading researcher, Department of Chemical Carcinogenesis, N.N. Blokhin NMRCO (Moscow, Russia). E-mail: belitsga@mail.ru.

Tatiana N. Zabolotina, PhD, DSc, Head of Clinical-laboratory Department, N.N. Blokhin NMRCO (Moscow, Russia). E-mail: tatzabotina@yandex.ru.

Katerina Gurova, PhD, Head of the Laboratory of Cell Stress Biology, Roswell Park Cancer Center (Moscow, Russia). E-mail: katerina.gurova@roswellpark.org.

Kirill I. Kirsanov, PhD, Head of Laboratory of Chemical Carcinogens, N.N. Blokhin NMRCO (Moscow, Russia). E-mail: kkirsanov85@yandex.ru.

Marianna G. Yakubovskaya, MD, PhD, DSc, Head of Department of Chemical Carcinogenesis, N.N. Blokhin NMRCO (Moscow, Russia). E-mail: mgyakubovskaya@mail.ru.

Funding

This work was supported by the Russian Science Foundation (project 17-15-01526).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Для цитирования: Лыков А.П., Кабаков А.В., Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Райтер Т.В., Казаков О.В., Стрункин Д.Н., Суровцева М.А., Повещенко А.Ф., Коненков В.И. Опухоль-ассоциированные мезенхимные стволовые клетки при химически индуцированном раке молочной железы у крыс Wistar. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 56–64. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-56-64.

For citation: Lykov A.P., Kabakov A.V., Bondarenko N.A., Poveshchenko O.V., Rayter T.V., Kazakov O.V., Strunkin D.N., Surovtseva M.A., Poveshchenko A.F., Konenkov V.I. Tumor-associated mesenchymal stem cells in chemically-induced breast cancer in Wistar rats. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 56–64. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-56-64.

ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ПРИ ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У КРЫС WISTAR

А.П. Лыков^{1,2}, А.В. Кабаков¹, Н.А. Бондаренко^{1,2}, О.В. Повещенко^{1,2},
Т.В. Райтер¹, О.В. Казаков¹, Д.Н. Стрункин³, М.А. Суровцева^{1,2},
А.Ф. Повещенко^{1,2,3,4,5}, В.И. Коненков¹

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал
Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия¹
Россия, г. Новосибирск, 630060, ул. Тимакова, 2. E-mail: aplykov2@mail.ru¹

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина
Министерства здравоохранения Российской Федерации», г. Новосибирск, Россия²
Россия, г. Новосибирск, 630055, ул. Речкуновская, 15²

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия³

Россия, г. Новосибирск, 630099, ул. Ядринцевская, 14³

ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет»,
г. Новосибирск, Россия⁴

Россия, г. Новосибирск, 630091, Красный Проспект, 52⁴

ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет»,
г. Новосибирск, Россия⁵

Россия, г. Новосибирск, 630126, ул. Вилюйская, 28⁵

Аннотация

Цель исследования – сравнить морфофункциональные свойства мезенхимных стволовых клеток из тканей молочной железы и ткани химически-индуцированной опухоли молочной железы. **Материал и методы.** У 20 крыс-самок Wistar после синхронизации эструса хорионическим гонадотропином, интрамаммарным введением N-метил-N-нитрозомочевины индуцирована аденокарцинома молочной железы, контрольную группу составили 5 крыс. Верификацию опухоли проводили гистологически и иммуногистохимически. Принадлежность выделенных клеток из ткани молочной железы и опухоли молочной железы к мезенхимным стволовым клеткам верифицировали на основании морфологии и фенотипирования на проточном цитофлуориметре FACS Canto II. Функциональные свойства мезенхимных стволовых клеток оценивали в МТТ-тесте и по уровню продукции оксида азота в норме и при индукции перекисью водорода окислительного стресса. Уровни пролактина, лютеинизирующего гормона и эстрадиола E_2 в моче исследовали твердофазным иммуноферментным анализом. **Результаты.** Химически индуцированная опухоль молочной железы по данным гистологического и иммуногистохимического исследования соответствовала люминальному B1 типу рака молочной железы у человека. Уровни пролактина в моче после синхронизации эструса у животных с развившейся опухолью были повышены, а у животных с неразвившейся опухолью молочной железы снижены уровни пролактина и лютеинизирующего гормона, но повышены уровни эстрадиола E_2 . Из ткани опухоли молочной железы получено большее количество мезенхимных стволовых клеток с фенотипом CD45-/CD90+. Мезенхимные стволовые клетки из ткани опухоли проявляли повышенный пролиферативный потенциал и были более устойчивы к окислительному стрессу. **Заключение.** Из ткани химически индуцированной опухоли молочной железы получены опухоль-ассоциированные мезенхимные стволовые клетки, которые имеют высокий пролиферативный потенциал и устойчивы к окислительному стрессу. Выявленные

морфофункциональные различия мезенхимных стволовых клеток из тканей молочных желез и ткани опухоли молочной железы требуют дальнейшего исследования.

Ключевые слова: опухоль молочной железы, мезенхимные стволовые клетки, пролиферация, оксид азота, половые гормоны, моча.

TUMOR-ASSOCIATED MESENCHYMAL STEM CELLS IN CHEMICALLY-INDUCED BREAST CANCER IN WISTAR RATS

A.P. Lykov^{1,2}, A.V. Kabakov¹, N.A. Bondarenko^{1,2}, O.V. Poveshchenko^{1,2},
T.V. Rayter¹, O.V. Kazakov¹, D.N. Strunkin², M.A. Surovtseva^{1,2},
A.F. Poveshchenko^{1,2,3,4,5}, V.I. Konenkov¹

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics. Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia¹

2, Timakova Street, 630060-Novosibirsk, Russia. E-mail: aplykov2@mail.ru¹

Research Institute of Circulation Pathology, Ministry of Health Care of Russian Federation, Novosibirsk, Russia²

15, Rechkunovskaya Street, 630055-Novosibirsk, Russia²

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia³

14, Yadrinitskaya Street, 630099-Novosibirsk, Russia³

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia⁴

52, Krasny prospect, 630091-Novosibirsk, Russia⁴

Novosibirsk State Pedagogic University, Novosibirsk, Russia⁵

28, Vilyuiskaya Street, 630126-Novosibirsk, Russia⁵

Abstract

Objective: to compare the morphological and functional properties of mesenchymal stem cells from mammary tissues and chemically-induced mammary tumor tissues. **Material and Methods.** The study included 25 female Wistar rats. In 20 rats, mammary carcinoma was induced by intramammary injection of N-methyl-N-nitrosourea after estrus synchronization with chorionic gonadotropin. The control group consisted of 5 rats. Mammary carcinoma was verified histologically and immunohistochemically. To examine, whether the cells isolated from normal tissue and tumor tissue belonged to mesenchymal stem cells, FACS Canto II flow cytometer was used. The functional properties of mesenchymal stem cells were evaluated in MTT assay by the level of nitric oxide production in normal and by hydrogen peroxide-induced hypoxia. The levels of prolactin, luteinizing hormone and estradiol E₂ in urine were studied using solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. **Results.** Chemically-induced mammary tumor according to histological and immunohistochemical studies corresponded to luminal B type breast cancer in humans. In rats that developed mammary tumors, the urine prolactin levels after synchronization of estrus were increased. In rats that did not develop tumors, the levels of prolactin and luteinizing hormone were decreased, but the levels of estradiol E₂ were increased. More mesenchymal stem cells with CD45-/CD90+ phenotype were obtained from the breast tumor tissue. Mesenchymal stem cells from tumor tissue showed increased proliferative potential and were more resistant to hypoxia. **Conclusion.** Tumor-associated mesenchymal stem cells having high proliferative potential and resistance to hypoxia were obtained from chemically-induced mammary tumor tissue. Morphologic and functional differences in mesenchymal stem cells obtained from mammary breast tissue and tumor tissue require further studies.

Key words: breast tumor, mesenchymal stem cells, proliferation, nitric oxide, sex hormones, urine.

Химически индуцированный N-метил-N-нитрозомочевинной рак молочной железы у лабораторных животных является аналогом рака молочной железы у человека [1]. При интрамаммарном введении N-метил-N-нитрозомочевины развитие опухоли молочной железы индуцируется в 92 %, механизмы резистентности в индукции опухолевой трансформации при таком способе инициации опухоли молочной железы мало исследованы. В патогенезе рака молочной железы существенная роль отводится гормонам, в том числе и половым [2], в частности образованию эстрогенов из андрогенов in situ

как следствие повышенной экспрессии ароматазы в тканях молочных желез [3]. Не менее важная роль в патогенезе рака молочной железы отводится и клеточному составу опухолевого микроокружения, включая и клетки стромы опухоли. Показано, что нормальные фибробласты стромы молочных желез подавляют рост опухоли, в то же время опухоль-ассоциированные фибробласты усиливают канцерогенез [4]. О наличии проонкогенного действия мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК) при раке молочной железы сообщается в литературе [5–6].

Цель исследования – изучение морфофункциональных свойств МСК крыс-самок Wistar, выделенных из ткани химически индуцированной опухоли молочной железы, контралатеральной молочной железы и ткани молочной железы интактных животных.

Материал и методы

Эксперименты на лабораторных животных проведены с соблюдением принципов гуманного обращения с животными, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ECC) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Эксперимент выполнен на 25 крысах-самках Wistar массой 300–350 г. Опухоль молочной железы у 20 крыс-самок Wistar после синхронизации эструса (3 МЕ/крысу хорионического гонадотропина внутривбрюшинно, Гонадотропин хорионический, Московский эндокринный завод, Россия) индуцировали введением N-метил-N-нитрозомочевина (30 мг/кг, Sigma-Aldrich, США) 5 раз с интервалом в 7 дней подкожно в область одной и той же молочной железы (2-я молочная железа справа).

Спустя 6 мес выделяли ткань опухоли молочной железы, ткань из контралатеральной молочной железы и ткань молочной железы от интактных животных, измельчали ножницами и подвергали ферментативной диссоциации инкубацией при 37 °C с 0,05 % раствором коллагеназы I типа (Sigma-Aldrich, США) в течение 4 ч. После отмывки диссоциированных клеток из тканей молочной железы и тканей опухоли молочной железы клетки рассеивали в пластиковые флаконы (TPP, Швейцария) в питательной среде DMEM, дополненной 80 мкг/мл гентамицина сульфата, 2 мМ L-глутамина (ICN, США) и 15 % фетальной телячьей сыворотки, и растили при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Через 48 ч не прикрепленные к пластику клетки удаляли, а прилипающую фракцию клеток культивировали до получения конфлюэнтного слоя. Снятие МСК осуществляли с использованием 0,25 % раствора трипсина и 0,02 % раствора ЭДТА (ICN, США). Пролиферацию МСК в присутствии и в отсутствие 100 мМ H₂O₂ оценивали через 72 ч спектрофотометрически (длина волны 492 нм) по включению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ-тест). В кондиционных средах от МСК, росших в присутствии и в отсутствие 100 мМ H₂O₂ в течение 72 ч, спектрофотометрически определяли уровни оксида азота (NO) с использованием реактива Грисса. Фенотип МСК от 3-го пассажа исследовали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II с использованием FITC-конъюгированных моноклональных антител к CD45 и PE-конъюгированных моноклональных антител к CD90 (Sony, Япония). Гистологическое исследование опухолевой ткани

проводили по общепринятой методике с окраской гематоксилином и эозином и последующим анализом на микроскопе Olympus BX41. Иммуногистохимически (ИГХ) определяли экспрессию эстрогеновых рецепторов α , прогестероновых рецепторов, Her2/neu рецепторов и интенсивность пролиферации по Ki67. ИГХ проводили на автоматической платформе для окрашивания Autostainer Link48 (Dako, Дания): образцы помещали Target Retrieval Solution buffer (Dako, Дания) с использованием PreTreatment Link Platform (Dako, Дания). Далее срезы отмывали смесью TBS/0,05 % Tween buffer в течение 5 мин с EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent для блокирования эндогенной пероксидазной активности. Далее срезы отмывали смесью TBS/0,05 % Tween buffer и инкубировали с первичными антителами: к α -рецептору эстрогена (кроличьи антитела, клон E115, pH 9,0 и рабочее разведение 1:100, Novus Biologicals, Германия); к рецептору прогестерона (кроличьи антитела, Polyclonal, pH 9,0 и рабочее разведение 1:100, Novus Biologicals, Германия); к Her2/neu рецептору (кроличьи антитела, клон SP3, pH 6,0 и рабочее разведение 1:300, Labvision, Швеция); к Ki67 (мышинные антитела, клон MIB-5, pH 6,0 и рабочее разведение 1:25, Dako, Дания). Далее срезы отмывали смесью TBS/0,05 % Tween buffer в течение 20 мин при комнатной температуре с EnVision FLEX/horseradish peroxidase (HRP)-conjugated (вторичные меченные пероксидазой хрена антитела, Dako, Дания). После этого субстрат пероксидаза диаминобензидина (Dako, Дания) наносился на срезы, инкубация 10 мин при комнатной температуре. Далее срезы прокрашивали гематоксилином Майера, дегидратировали в спиртах (70 %; 96 %; 99,8 %) и ксилоле, после чего оценивали реакцию иммуногистохимии под микроскопом (Leica DM 750, Германия). Уровни гормонов в моче определяли иммуноферментным анализом с использованием коммерческих наборов: «Гонадотропин ИФА-ЛГ», «ИФА-Пролактин-01» производства ООО «Компания Алкор Био» (СПб., Россия) и «Estradiol ELISA» (DRG Diagnostics, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (LQ) и верхним (UQ) квартилями; достоверность различия рассчитывалась по U-критерию Манна – Уитни и принималась при значениях $p \leq 0,05$.

Результаты

Химически индуцированная опухоль молочной железы у крыс-самок Wistar развивалась в 90 %, макроскопически характеризовалась очаговыми образованиями с фиброзной оболочкой, нечеткими контурами, а у части животных с изъязвлениями и обызвествлением кожи над очагом опухолевого роста. В случаях несформировавшейся химически

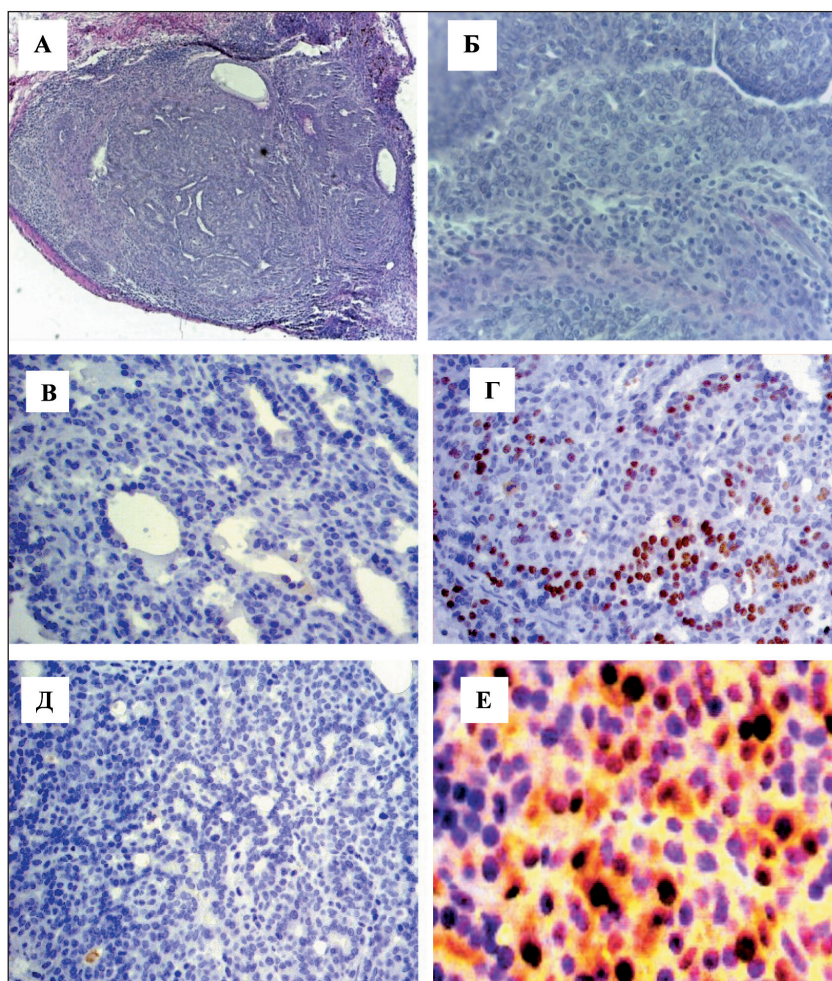


Рис. 1. Микрофото. Умеренно дифференцированная аденокарцинома с инфильтрирующим характером роста:

А – окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$; Б – окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$; В – негативная по экспрессии α -рецепторов к эстрогену кроличьи антитела, клон E115, Novus Biologicals, Германия, $\times 400$; Г – позитивная по экспрессии рецепторов к прогестерону, кроличьи антитела, Polyclonal, Novus Biologicals, Германия, $\times 400$; Д – негативная по экспрессии рецептора Her-2/neu кроличьи антитела, клон SP3, Labvision, Швеция, $\times 400$; Е – позитивная по Ki67 мышиные антитела, клон MIB-5, Dako, Дания, $\times 1000$

индуцированной опухоли молочной железы макроскопически ткань молочной железы состояла из фиброзных тяжей с небольшими включениями жировой ткани. Гистологическая и гистохимическая характеристика химически индуцированной опухоли молочной железы у крыс-самок Wistar представлена на рис. 1.

Микроскопически опухоль молочной железы характеризовалась наличием протоковых, железистых, криброзных структур, выстланных умеренно полиморфным эпителием с вариабельной митотической активностью; тубулярные структуры преобладали, отдельные участки ткани опухоли представлены перемешанными гнездами, цугами и группами отдельных клеток с менее оформленными протоками вплоть до их полного исчезновения, что соответствует умеренно дифференцированной аденокарциноме молочной железы (рис. 1А, Б). Более того, клетки умеренно дифференцированной карциномы молочной железы не несли рецепторы к эстрогену (рис. 1В) и к эпидермальному ростовому фактору человека Her-2/neu (рис. 1Д), но были позитивны по наличию рецепторов к прогестерону (рис. 1Г) и обладали высоким пролиферативным потенциалом по данным исследования Ki67 (рис.

1Е). Все это в совокупности позволяет нам рассматривать данную аденокарциному как аналог люминального В1 типа рака молочной железы человека, что согласуется с данными других исследователей [7].

С учетом вовлеченности половых гормонов в патогенез опухолей молочных желез нами исследованы уровни гормонов в моче крыс-самок Wistar после синхронизации эструса и спустя 6 мес после индукции опухоли молочной железы (табл. 1). Показано, что уровни пролактина в моче животных с развившейся опухолью молочной железы сразу после синхронизации эструса были выше, чем в контроле ($p \leq 0,05$). Уровни пролактина и лютеинизирующего гормона в моче мышей с неразвившейся опухолью были ниже, чем в контроле и у животных с развившейся опухолью молочной железы, а уровни в моче эстрадиола E_2 были выше по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Спустя 6 мес после синхронизации эструса и индукции N-метил-N-нитрозомочевинной опухоли молочной железы только у животных с неразвившейся опухолью молочной железы выявлены повышенные уровни в моче пролактина по сравнению с контролем и повышенные уровни

Таблица 1

Уровни гормонов в моче исследуемых групп крыс-самок Wistar (Me; LQ-UQ)

Параметры		Группы животных		
		Контрольная	С опухолью	Без опухоли
После синхронизации эструса	Пролактин (мМЕ/мл)	37,9	275,36	26,5
		37,5–39,2	253,36–282,7*	25,75–27,25***
	Лютеинизирующий гормон (мМЕ/мл)	2,32	2,88	0,92;
		2,23–2,35	2,09–4,74	0,71–1,13***
Через 6 мес после синхронизации эструса	Эстрадиол E ₂ (пг/мл)	139,4	220,83	202,8
		127,5–143,4	179,77–254,8	198,32–207,38*
	Пролактин (мМЕ/мл)	120,91	204,35	273,3
		116,7–133,7	156,5–252,2	224,1–322,5*
	Лютеинизирующий гормон (мМЕ/мл)	2,27	2,62	2,34
		2,15–2,66	2,48–2,8	1,32–3,36
	Эстрадиол E ₂ (пг/мл)	215,6	142,28	220,83
		206,23–218,66	134,39–150,2*	209,47–232,2**

Примечания: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с группой животных с опухолью молочной железы ($p \leq 0,05$).

эстрадиола E₂ по сравнению с животными с развившейся опухолью молочной железы ($p \leq 0,05$). Кроме этого, уровни в моче эстрадиола E₂ у крыс-самок с опухолью молочной железы были ниже, чем в контроле ($p \leq 0,05$).

Необходимо отметить тот факт, что между уровнями лютеинизирующего гормона и эстрадиола E₂ в моче животных сразу после синхронизации эструса, у которых развивается опухоль молочной железы, была выявлена обратная и сильная сопряженность ($r = -0,89$, $p \leq 0,05$). В то же время в группе животных, у которых не развилась опухоль молочной железы, сразу после синхронизации эструса уровни пролактина в моче находились в прямой и сильной сопряженности с лютеинизирующим гормоном ($r = 0,92$, $p \leq 0,05$) и сильной и обратной взаимосвязи с эстрадиолом E₂ через 6 мес ($r = -0,92$, $p \leq 0,05$). Кроме этого, в этой группе выявлена прямая и сильная связь уровней лютеинизирующего гормона в моче сразу после синхронизации эструса с эстрадиолом E₂ ($r = 0,92$, $p \leq 0,05$) в эти же временные рамки наблюдалась обратная и сильная сопряженность с пролактином и лютеинизирующим гормоном спустя 6 мес ($r = -0,92$, $p \leq 0,05$). Исходные уровни в моче

эстрадиола E₂ находились в обратной и сильной взаимосвязи с уровнями эстрадиола E₂ в моче этих животных спустя 6 мес ($r = -0,92$, $p \leq 0,05$). Установлено, что уровни эстрадиола E₂ в моче животных без опухоли спустя 6 мес после синхронизации эструса и индукции опухоли молочной железы N-метил-N-нитрозомочевинной находились в прямой и сильной связи с пролактином и лютеинизирующим гормоном ($r = 0,92$, $p \leq 0,05$).

Культуры клеток МСК, выделенных из тканей молочной железы и тканей опухоли молочной железы, были фибробластоподобной морфологии (рис. 2). В группе животных с опухолью молочной железы из ткани опухоли выделено большее количество МСК по сравнению с остальными источниками получения МСК ($p \leq 0,05$). Более того, именно в этой группе в ткани опухоли молочной железы большее количество МСК с фенотипом CD45-/CD90+, чем в остальных образцах тканей молочных желез ($p \leq 0,05$). Кроме этого, МСК, выделенные из ткани опухоли, имели повышенный пролиферативный потенциал и были более устойчивы к окислительному стрессу *in vitro*, чем МСК, полученные из других источников ($p \leq 0,05$). МСК,

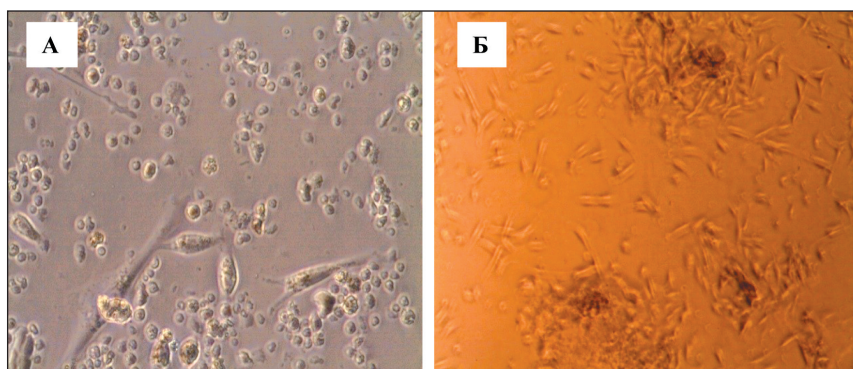


Рис. 2. Фибробластоподобная морфология опухоль-ассоциированных мезенхимных стромальных клеток (нативный препарат): А – единичные опухоль-ассоциированные МСК (вытянутые клетки) среди клеток опухоли молочной железы (округлые клетки), $\times 200$; Б – формирование колоний опухоль-ассоциированными МСК, $\times 40$

Таблица 2

Морфофункциональная характеристика мезенхимных стволовых клеток ткани молочной железы и химически индуцированной N-метил-N-нитрозомочевинной опухоли молочной железы у крыс-самок Wistar (Me; LQ-UQ)

Параметры	Источник выделения мезенхимных стромальных клеток				
	Молочные железы контрольной группы	Опухоль молочной железы группы с опухолью	Контралатеральная молочная железа группы с опухолью	Молочные железы группы без опухоли	Контралатеральная молочная железа группы без опухоли
Выход клеток (10 ⁶)	1,75; 1,75–1,87	6,0; 5,5–6,5*	2,75; 2,62–2,87**	2,37; 2,31–2,43***	1,75; 1,37–2,12***
CD45+/CD90-	0,1; 0,1–0,1	4,26; 3,53–4,99*	0,005; 0,0025–0,008**	0,96; 0,49–1,42* ****	0,04; 0,03–0,05* ****
CD45+/CD90+	0,05; 0,05–0,05	3,88; 3,84–3,92*	0,015; 0,00750,022*	0,085; 0,047–0,122**	0,0; 0,0–0,0***#
CD45-/CD90+	10,24; 10,24–10,243	25,99; 25,28–26,69*	15,23; 14,08–16,38* **	5,84; 5,75–5,92* ****	10,89; 9,9–11,85** ***#
Пролиферация	0,374; 0,373–0,374	0,69; 0,61–0,77*	0,47; 0,42–0,53***	0,32; 0,3–0,34***	0,424; 0,379–0,469* **
Пролиферация + H ₂ O ₂	0,386; 0,367–0,393	0,56; 0,54–0,58*	0,43; 0,4–0,47*	0,41; 0,35–0,46**	0,4; 0,38–0,43**
Продукция NO	19,58; 18,9–21,65	18,1; 18,05–18,15*	38,55; 32,25–44,87* **	15,5; 13,9–17,1****	21,95; 21,53–22,4* ***#
Продукция NO + H ₂ O ₂	25,42; 24,6–27,9	26,2; 26,2–26,2	31,45; 30,87–32,02* **	18,9; 17,75–20,05**	28,0; 27,0–29,1#

Примечания: CD – кластер дифференцировки; H₂O₂ – наличие в питательной среде 100 мМ H₂O₂; NO – оксид азота; * – различия статистически значимы по сравнению с контролем (p≤0,05); ** – различия статистически значимы по сравнению с группой с опухолью молочной железы (p≤0,05); *** – различия статистически значимы по сравнению с контралатеральной молочной железой в группе с опухолью молочной железы (p≤0,05); # – различия статистически значимы по сравнению с группой без опухоли молочной железы (p≤0,05).

выделенные из ткани опухоли молочной железы и из ткани неразвившейся опухоли молочной железы, в меньшей степени продуцировали NO (p≤0,05).

У крыс-самок с опухолью молочной железы показано наличие сильной и обратной связи количества клеток с фенотипом CD45+/CD90+ с пролиферативной активностью МСК в условиях окислительного стресса и уровнями продукции NO, а также с исходными уровнями пролактина в моче после синхронизации эструса (r=-0,92; r=-0,91 и r=-0,97, p≤0,05 соответственно). В группе животных с неразвившейся опухолью молочной железы количество клеток с фенотипом CD45+/CD90+ и количество клеток с фенотипом CD45-/CD90+ находились в обратной и сильной связи с уровнями в моче сразу после синхронизации эструса лютеинизирующего гормона (r=-0,917, p≤0,05) и в прямой и сильной связи с уровнями в моче спустя 6 мес эстрадиола E₂ (r=0,92, p≤0,05). Пролиферативный потенциал МСК в присутствии и в отсутствие перекиси водорода находился в обратной и сильной связи с уровнями в моче спустя 6 мес эстрадиола E₂ (r=-0,917, p≤0,05). Уровни продукции МСК оксида азота в отсутствие перекиси водорода находились в обратной и сильной связи с уровнями эстрадиола E₂ спустя 6 мес после синхронизации эструса (r=-0,917, p≤0,05), а в присутствии перекиси водорода – в прямой и сильной связи (r=0,917, p≤0,05).

Обсуждение

Известно, что опухоль-ассоциированное микроокружение, в том числе и МСК, играет существенную роль в канцерогенезе [5]. Показано, что опухоль-ассоциируемые фибробласты и МСК инициируют провоспалительное микроокружение в области роста опухолевых клеток и тем самым по типу хронического воспаления инициируют условия для злокачественной трансформации клеток молочных желез [8]. Известно также, что МСК обладают тропизмом к опухолям, способствуют их росту и метастазированию [9]. В основе данного эффекта МСК лежит паракринное влияние секретируемых МСК факторов, приводящее к снижению экспрессии Е-кадгерина и повышению экспрессии протеинов, необходимых для эпителиально-мезенхимного перехода (N-кадгерин, виментин, фибронектин) [9]. О роли секретируемых МСК, выделенных из опухолей молочных желез, свидетельствуют данные L. Usha et al. [10], которые показали, что кондиционная среда от МСК активирует пролиферативный и миграционный потенциал МСК. *In vitro* авторы обнаружили антипролиферативное влияние кондиционных сред на опухолевые клеточные линии как следствие задержки в G₀/G₁ фазе клеточного цикла, но данный эффект не установлен *in vivo*. Также показано, что МСК из тканей молочных желез способствуют пенетрации компонентов внеклеточного матрикса опосредованно через экспрессию ММП-1 и ММП-3, тем самым способствуя инвазии опухолевых клеток [11].

Полученные нами результаты исследования фенотипа МСК, выделенных из тканей молочных желез и тканей опухоли молочных желез, согласуются с результатами исследований других авторов, которые также отметили экспрессию МСК из тканей опухоли человека поверхностных маркеров, характерных для мезенхимных стволовых клеток, и были способны к цитодифференцировке в остеогенном и адипогенном направлении [6].

Заключение

Из ткани опухоли молочной железы, химически индуцированной интрамаммарным введением N-метил-N-нитрозомочевина, получены опухоле-

ассоциированные мезенхимные стволовые клетки, которые имеют высокий пролиферативный потенциал и устойчивы к окислительному стрессу. В основе резистентности к действию N-метил-N-нитрозомочевина у крыс-самок Wistar могут лежать генетическая неоднородность данных животных и, как следствие, различные уровни половых гормонов, вовлеченных в канцерогенез при опухолях молочных желез, а также количество МСК в ткани молочной железы и их морфофункциональные свойства. Выявленные морфофункциональные различия мезенхимных стволовых клеток из тканей молочных желез и ткани опухоли молочной железы требуют дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Чочиева А.Р. Исследование влияния летрозола на некоторые показатели гормонально-метаболического статуса при экспериментальном раке молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2008; 1: 100–102. [Chochieva A.R. The study of the influence of letrozole on some factors of hormonal and metabolic status under experimental carcinogenesis of the mammary gland. Siberian Journal of Oncology. 2008; 1: 100–102. (in Russian)].
2. Лыков А.П., Кабаков А.В., Казаков О.В., Бондаренко Н.А., Повещенко О.В., Райтер Т.В., Повещенко А.Ф., Струнkin Д.Н., Коненков В.И. Уровни микроРНК и гормонов в лимфе грудного протока крыс на модели рака молочной железы, индуцированной N-метил-N-нитрозомочевинной. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016; 162 (9): 374–377. [Lykov A.P., Kabakov A.V., Kazakov O.V., Bondarenko N.A., Poveshchenko O.V., Raiter T.V., Poveshchenko A.F., Strunkin D.N., Konenkov V.I. Levels of miRNAs and hormones in the lymph of the thoracic duct of rats on a model of breast cancer induced by N-methyl-N-nitrosourea. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2016; 162 (9): 374–377. (in Russian)].
3. Farhat G.N., Cummings S.R., Chlebowski R.T., Parimi N., Cauley J.A., Rohan T.E., Huang A.J., Vitolins M., Hubbell F.A., Manson J.E., Cochrane B.B., Lane D.S., Lee J.S. Sex hormone levels and risks of estrogen receptor-negative and estrogen receptor-positive breast cancers. J Natl Cancer Inst. 2011 Apr 6; 103 (7): 562–70. doi: 10.1093/jnci/djr031.
4. Al-Rakan M.A., Colak D., Hendrayani S.F., Al-Bakheet A., Al-Mohanna F.H., Kaya N., Al-Malik O., Aboussekhra A. Breast stromal fibroblasts from histologically normal surgical margins are pro-carcinogenic. J Pathol. 2013 Dec; 231 (4): 457–65. doi: 10.1002/path.4256.
5. Cuijfo B.G., Campagne A., Bell G.W., Lembo A., Orso F., Lien E.C., Bhasin M.K., Raimo M., Hanson S.E., Marusyk A., El-Ashry D., Hematti P., Polyak K., Mehta-Grigoriou F., Mariani O., Volinia S., Vincent-Salomon A., Taverna D., Karnoub A.E. MSC-regulated microRNAs converge on the transcription factor FOXF2 and promote breast cancer

metastasis. Cell Stem Cell. 2014 Dec 4; 15 (6): 762–74. doi: 10.1016/j.stem.2014.10.001.

6. Zhang C., Zhai W., Xie Y., Chen Q., Zhu W., Sun X. Mesenchymal stem cells derived from breast cancer tissue promote the proliferation and migration of the MCF-7 cell line in vitro. Oncol Lett. 2013 Dec; 6 (6): 1577–1582.

7. El-Abd E., Matta C.A., Sheta M., El-Kerm Y., Sakr S. Histopathological characteristics of breast cancer and evaluation of ER alpha and Her-2neu using immunohistochemical and RT-PCR techniques. Alexandria J Medicine. 2014; 50: 275–282.

8. Katanov C., Lerrer S., Liubomirski Y., Leider-Trejo L., Meshel T., Bar J., Feniger-Barish R., Kamer I., Soria-Artzi G., Kahani H., Banerjee D., Ben-Baruch A. Regulation of the inflammatory profile of stromal cells in human breast cancer: prominent roles for TNF- α and the NF- κ B pathway. Stem Cell Res Ther. 2015 May 1; 6: 87. doi: 10.1186/s13287-015-0080-7.

9. Lacerda L., Debeb B.G., Smith D., Larson R., Solley T., Xu W., Krishnamurthy S., Gong Y., Levy L.B., Buchholz T., Ueno N.T., Klopp A., Woodward W.A. Mesenchymal stem cells mediate the clinical phenotype of inflammatory breast cancer in a preclinical model. Breast Cancer Res. 2015; 17: 42. doi: 10.1186/s13058-015-0549-4.

10. Usha L., Rao G., Christopherson Ii K., Xu X. Mesenchymal stem cells develop tumor tropism but do not accelerate breast cancer tumorigenesis in a somatic mouse breast cancer model. PLoS One. 2013 Sep 12; 8 (9): e67895. doi: 10.1371/journal.pone.0067895.

11. Zhao M., Sachs P.C., Wang X., Dumur C.I., Idowu M.O., Robila V., Francis M.P., Ware J., Beckman M., Rizki A., Holt S.E., Elmore L.W. Mesenchymal stem cells in mammary adipose tissue stimulate progression of breast cancer resembling the basal-type. Cancer Biol Ther. 2012 Jul; 13 (9): 782–92.

Поступила/Received 14.05.18

Принята в печать/Accepted 22.10.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Лыков Александр Петрович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия); старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Центр новых технологий, ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ (г. Новосибирск, Россия). E-mail: aplykov2@mail.ru. SPIN-код: 4883-0887. Author ID (Scopus): 7005078323. Researcher ID (WOS): I-1999-2018. ORCID: 0000-0003-4897-8676.

Кабаков Алексей Васильевич, младший научный сотрудник лаборатории физиологии протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 8615-2370. Author ID (Scopus): 57190570129. Researcher ID (WOS): J-3271-2018. ORCID: 0000-0002-4741-6674.

Бондаренко Наталья Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия); старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Центр новых технологий, ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 5722-7157. Author ID (Scopus): 16424587900. Researcher ID (WOS): I-2000-2018. ORCID: 0000-0002-8443-656X.

Повещенко Ольга Владимировна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия); старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Центра новых технологий

ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 1451-4467. Author ID (Scopus): 6505824790. Researcher ID (WOS): J-3328-2018. ORCID: 0000-0001-9956-0056.

Райтер Татьяна Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории физиологии протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 6424-1517. Author ID (Scopus): 57190571932. ORCID: 0000-0003-0883-9516.

Казаков Олег Васильевич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 4565-7180. Author ID (Scopus): 57192956902. Researcher ID (WOS): J-3282-2018. ORCID: 0000-0003-3947-4038

Стрункин Дмитрий Николаевич, врач-онколог, НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 1983-9314. Author ID (Scopus): 12800338500. ORCID: 0000-0003-4357-7443.

Суровцева Мария Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия); старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Центр новых технологий, ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 5597-4170. Author ID (Scopus): 35075192200. Researcher ID (WOS): J-3408-2018. ORCID: 0000-0002-4752-988X.

Повешенко Александр Федорович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией физиологии протективной системы, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН; ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, Центр новых технологий, ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» (г. Новосибирск, Россия); преподаватель, Новосибирский государственный медицинский университет (г. Новосибирск, Россия); преподаватель, Новосибирский государственный педагогический университет (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 6495-7412. Author ID (Scopus): 6603573909. Researcher ID (WOS): J-3424-2018. ORCID: 0000-0002-4433-7110.

Коненков Владимир Иосифович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 7822-9674. Author ID (Scopus): 7005910476. Researcher ID (WOS): J-6329-2018. ORCID: 0000-0001-7385-6270.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Alexander P. Lykov, MD, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia); Staff Researcher, Cellular Technologies Laboratory, Institute of Circulation Pathology (Novosibirsk, Russia). E-mail: aplykov2@mail.ru. Author ID (Scopus): 7005078323. Researcher ID (WOS): I-1999-2018. ORCID: 0000-0003-4897-8676.

Alexei V. Kabakov, MD, Researcher, Laboratory of Protective System Physiology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 57190570129. Researcher ID (WOS): J-3271-2018. ORCID: 0000-0002-4741-6674.

Nataliya A. Bondarenko, PhD, Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia); Staff Researcher, Cellular Technologies Laboratory, Institute of Circulation Pathology (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 16424587900. Researcher ID (WOS): I-2000-2018. ORCID: 0000-0002-8443-656X.

Olga V. Poveshchenko, MD, DSc, Head of Laboratory of Cellular Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia); Head of Laboratory, Cellular Technologies Laboratory, Institute of Circulation Pathology (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 6505824790. Researcher ID (WOS): J-3328-2018. ORCID: 0000-0001-9956-0056.

Tatjana V. Raiter, Researcher, Laboratory of Protective System Physiology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 57190571932. ORCID: 0000-0003-0883-9516.

Oleg V. Kazakov, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Protective System Physiology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 57192956902. Researcher ID (WOS): J-3282-2018. ORCID: 0000-0003-3947-4038.

Dimitri N. Strunkin, MD, Oncologist, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 12800338500. ORCID: 0000-0003-4357-7443.

Maria A. Surovtseva, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia); Staff Researcher, Cellular Technologies Laboratory, Institute of Circulation Pathology (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 35075192200. Researcher ID (WOS): J-3408-2018. ORCID: 0000-0002-4752-988X.

Alexander F. Poveshchenko, MD, DSc, Head of Laboratory of Protective System Physiology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia); Senior Researcher, Cellular Technologies

Laboratory, Institute of Circulation Pathology (Novosibirsk, Russia); Teacher, Novosibirsk State Medical University (Novosibirsk, Russia); Teacher, Novosibirsk State Pedagogic University (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 6603573909. Researcher ID (WOS): J-3424-2018.

Vladimir I. Konenkov, MD, DSc, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 7005910476. Researcher ID (WOS): J-6329-2018. ORCID: 0000-0001-7385-6270.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Для цитирования: Бакина О.В., Первиков А.В., Глазкова Е.А., Сваровская Н.В., Ложкомоев А.С., Лернер М.И., Августинovich А.В. Новые магнитоуправляемые биметаллические «янус»-наночастицы Ag-Fe для современной противоопухолевой терапии. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 65–70. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-65-70.
For citation: Bakina O.V., Pervikov A.V., Glazkova E.A., Svarovskaya N.V., Lozhkomoev A.S., Lerner M.I., Avgustinovich A.V. New magnetic bimetallic yanus-like Ag-Fe nanoparticles for antitumour therapy. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 65–70. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-65-70.

НОВЫЕ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫЕ БИМЕТАЛЛИЧЕСКИЕ «ЯНУС»-НАНОЧАСТИЦЫ Ag-Fe ДЛЯ СОВРЕМЕННОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

О.В. Бакина¹, А.В. Первиков¹, Е.А. Глазкова¹, Н.В. Сваровская¹,
А.С. Ложкомоев¹, М.И. Лернер¹, А.В. Августинovich²

Институт физики прочности и материаловедения Сибирского отделения Российской академии наук,
г. Томск, Россия¹

Россия, г. Томск, 634055, пр. Академический, 2/4. E-mail: ovbakina@ispms.tsc.ru¹

Консультативно-диагностический центр с поликлиникой управления делами Президента Российской
Федерации, г. Санкт-Петербург, Россия²

Россия, г. Санкт-Петербург, 197110, Морской проспект, 3. E-mail: aov862@yandex.ru²

Аннотация

Цель исследования – изучить противоопухолевую активность магнитных биметаллических наночастиц Ag-Fe со структурой «янус»-наночастиц, полученных методом электрического взрыва проводника. **Материал и методы.** Для синтеза биметаллических наночастиц Ag-Fe использовали совместный электрический взрыв серебряной и железной проволок в атмосфере аргона. Морфологию и размер наночастиц и их агломератов определяли методом просвечивающей электронной микроскопии. Для определения среднего размера наночастиц по данным электронной микроскопии строились гистограммы распределения частиц по размерам, которые аппроксимировали нормально-логарифмическим законом. Фазовый состав определяли с помощью рентгенографического метода. Цитотоксическое действие наночастиц определяли при помощи МТТ-теста на культурах базальных клеток нейробластомы мыши Neuro 2a и гистиоцитарной саркомы мыши J 774. **Результаты.** При совместном электрическом взрыве серебряной и железной проволок в атмосфере аргона были получены сферические частицы размером 72 нм. Показано, что серебро и железо неравномерно распределены по частицам. Встречаются участки, обогащенные одним из компонентов, с четкими границами разделения фаз, или «янус»-наночастицы. На дифрактограмме образца основные рефлексы соответствуют фазам металлического Ag и Fe. Водные суспензии наночастиц отдельных металлов серебра и железа в меньшей степени снижали жизнеспособность клеток по сравнению с биметаллическими наночастицами. Наибольшую дозозависимую противоопухолевую активность продемонстрировали наночастицы Ag-Fe. Более высокая скорость коррозии биметаллических частиц Ag-Fe по сравнению с монометаллическими наночастицами обусловлена большей площадью контактов между металлическими фазами в «янус»-наночастицах, которые определяют большее число центров коррозии в биметаллических наночастицах. **Заключение.** В результате электрического взрыва проволок из несмешивающихся металлов железа и серебра были получены биметаллические наночастицы Ag-Fe со структурой «янус»-частиц. Наночастицы Ag-Fe демонстрируют более высокую противоопухолевую активность, чем отдельные металлы, из которых они состоят, и представляют собой перспективный материал для борьбы с раковыми клетками.

Ключевые слова: электрический взрыв проводников, «янус»-наночастицы, сегрегированная структура, МТТ-тест, металлы железа, металлы серебра, электронная микроскопия, биосовместимость, синтезированные наночастицы.

NEW MAGNETIC BIMETALLIC YANUS-LIKE Ag-Fe NANOPARTICLES FOR ANTITUMINE THERAPY

O.V. Bakina¹, A.V. Pervikov, E.A. Glazkova¹, N.V. Svarovskaya¹,
A.S. Lozhkomoev¹, M.I. Lerner¹, A.V. Avgustinovich²

Institute of Strength Physics and Materials Science of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

2/4, Akademicheskii Prospekt, 634021-Tomsk, Russia. E-mail: ovbakina@ispms.tsc.ru¹

Federal State Establishment Clinical Diagnostic Medical Centre, Saint-Peterburg, Russia²

3, Morskoy Prospekt, 197110-Saint-Peterburg, Russia. E-mail: aov862@yandex.ru²

Abstract

The purpose of the study was to analyze the antitumor activity of magnetic bimetallic Ag-Fe nanoparticles having the structure of Janus particles produced by the electrical explosion of wires. **Material and Methods.** For the synthesis of bimetallic Ag-Fe nanoparticles, a simultaneous electric explosion of silver and iron wires in an argon atmosphere was used. The morphology and size of the nanoparticles and their agglomerates were determined by transmission electron microscopy. To determine the average size of nanoparticles, particle size distribution histograms approximated by log-normal distribution were plotted. The phase composition was determined using x-ray method. The cytotoxic effect of the nanoparticles was evaluated by MTT assay using mouse neuro-2a (N2a) neuroblastoma cell lines and J774 histiocytic sarcoma cell lines. **Results.** In case of simultaneous electric explosion of silver and iron wires in an argon atmosphere, the spherical 72 nm particles were obtained. Silver and iron were shown to be unevenly distributed in particles. There were areas enriched with one of the components with clear boundaries of phase separation or Janus nanoparticles. On the diffractogram of the sample, the main reflections correspond to the phases of metallic Ag and Fe. Aqueous suspensions of monometallic Ag and Fe nanoparticles reduced cell viability to a lesser extent than bimetallic nanoparticles. Ag-Fe nanoparticles showed the highest dose-dependent antitumor activity. The higher corrosion rate of bimetallic Ag-Fe particles compared to monometallic nanoparticles was due to the larger contact area between metallic phases in Janus nanoparticles, which determined a larger number of corrosion centers in bimetallic nanoparticles. **Conclusion.** As a result of an electric explosion of wires from immiscible metals of iron and silver, bimetallic Ag-Fe nanoparticles with Janus particle structure were obtained. Ag-Fe nanoparticles exhibit higher antitumor activity than the individual metals from which they are composed and are a promising material for the fight against cancer cells.

Key words: electric explosion of wires, Janus nanoparticles, segregated structure, MTT assay, MTT-test, iron metals, silver metals, electron microscopy, biocompatibility, synthesized nanoparticles.

Введение

Уникальные оптические и магнитные свойства металлических наночастиц, развитая поверхность и высокая химическая активность открывают новые возможности разработки препаратов для терапии злокачественных опухолей. Магнитные наночастицы широко применяют для магнитной сепарации [1], целевой доставки лекарственных препаратов [2], в качестве агентов в магнитно-резонансной томографии [3]. Направленная доставка препаратов с использованием магнитных наночастиц при помощи внешнего магнитного поля позволяет повысить эффективность стандартных подходов для лечения рака [4].

Несмотря на то, что большинство исследований по борьбе с раковыми клетками сосредоточено на применении наночастиц платины и золота, применение наночастиц серебра, безусловно, является перспективным [5]. Серебро менее токсично для организма человека, только длительное воздействие может в редких случаях вызвать аллергическую реакцию [6]. О применении серебра в онкологии

сообщалось уже сравнительно давно [7, 8], однако механизм действия серебра не был полностью выяснен. Считается, что высвобождение ионов Ag позволяет им проникать в клеточную мембрану и нарушать ее функцию [9]. Для снижения токсического действия серебра перспективным является получение композитных наночастиц, состоящих из двух компонентов – противоопухолевого и магнитного (для доставки активного агента в нужную точку действия). В связи с этим применение биметаллических наночастиц, содержащих 2 металла, с разделенными компонентами на уровне одной частицы («янус»-наночастицы) позволяет совмещать противоопухолевые свойства одного металла с магнитными свойствами другого. Магнитные наночастицы железа благодаря биосовместимости, стабильности магнитных свойств и простоте модификации поверхности привлекают внимание как новые агенты для борьбы с опухолевыми клетками [10]. Однако применение наночастиц железа по отдельности ограничено их способностью вызывать образование опасных свободных радикалов,

агрегацией, приводящей к образованию тромбозов. Наличие серебра в частице позволит снизить степень агломерации железа и придаст стабильность синтезированным наночастицам.

В данной статье мы сообщаем о получении магнитных биметаллических наночастиц Ag-Fe со структурой «янус»-наночастиц методом электрического взрыва проводника. Синтезированные наночастицы обладают противоопухолевой активностью по отношению к раковым клеткам линий Neuro 2a и J 774, что показывает возможность будущего использования таких наночастиц в качестве современных противоопухолевых препаратов.

Материал и методы

Для синтеза биметаллических наночастиц Ag-Fe использовали совместный электрический взрыв серебряной и железной проволок в атмосфере аргона. Проволоки покупали у заводов-изготовителей, заявленное изготовителем содержание металлов в проволочках составляло не менее 98,0–99,0 % wt. Перед использованием проволоочки очищали органическим растворителем для удаления загрязнений с поверхности. Для получения наночастиц Ag-Fe проволоки из серебра и железа предварительно скручивали между собой. На две скрученные между собой проволоки подавали импульс тока высокой плотности ($\sim 10^7$ А/см²), получаемый при разряде батареи конденсаторов заданной емкости и заряженных до заданного напряжения (U). Зарядная емкость батареи конденсаторов и зарядное напряжение батареи конденсаторов выбирались таким образом, чтобы удельная энергия (E), переданная проволочкам Ag и Fe, была приблизительно одинакова и составляла $E = (1,6–1,8) E_s$, где E_s – сумма энергий сублимации металлов. При прохождении импульса тока через проволоки происходило взрывное диспергирование металла и быстрое расширение продуктов взрыва – аэрозоля из паров металлов – в окружающий газ (аргон). При этом продукты взрыва охлаждались и образовывались наночастицы. Поскольку непосредственно после синтеза нанопорошки пирофорны, перед использованием их пассивировали методом медленного напуска воздуха, поверхность частиц покрыта тонкой оксидной пленкой. Массовое соотношение Ag-Fe в образцах составило 50/50 % масс.

Морфологию и размер наночастиц и их агломератов определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (JEOL 2000FX, JEM, Japan, accelerating voltage 150 kV). Для определения среднего размера наночастиц по данным электронной микроскопии строились гистограммы распределения частиц по размерам. Полученные гистограммы аппроксимировали нормально-логарифмическим законом. Для построения каждой гистограммы измеряли размеры не менее 3000 частиц. Фазовый состав определяли с помощью рентгенографического метода на CoK_α -излучении

на дифрактометре Дрон-7 в режиме сканирования в интервале углов 20 от ~ 45 до 95° , с шагом $0,02^\circ$. Идентификацию фаз проводили с помощью программного комплекса PDF-2 Release 2014.

Цитотоксическое действие наночастиц определяли при помощи МТТ-теста на культурах базальных клеток нейробластомы мыши Neuro 2a и гистиоцитарной саркомы мыши J 774 (культуры предоставлены Государственным научным центром вирусологии и биотехнологии VECOR, Россия). Конечная концентрация клеток составила 1×10^4 клеток/100 мкл в лунке 96-луночного микропланшета. Клетки Neuro 2a (J 774) выращивали в виде монослоя в среде MEM (DMEM) с добавлением 10 % FCS, 2mM-глутамина и 1 % пенициллин/стрептомицина. Культивирование клеток проводили при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 5 % CO_2 в течение 24 ч. После инкубирования питательную среду удаляли и два раза промывали клетки раствором фосфатного буфера Дульбекко (DPBS). Для определения цитотоксичности использовали суспензии наноструктур в клеточной среде в концентрациях: 0,1 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,01 мг/мл и 0,001 мг/мл. Клетки с наночастицами инкубировали при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 5 % CO_2 в течение 24 ч. Для проведения МТТ-теста питательную среду удаляли и 2 раза промывали клетки раствором DPBS. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл питательной среды и по 10 мкл раствора МТТ (3-4,5-диметилтиазол-2,5 дифенил тетразилия бромид). Инкубирование с раствором МТТ проводили в течение 2 ч при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 5 % CO_2 . По окончании инкубирования питательную среду осторожно удаляли и добавляли в каждую лунку по 100 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана. Через 15 мин определяли оптическую плотность на микропланшетном спектрофотометре Tecan Infinite M1000 PRO (Tecan, Grodning, Австрия) при длине волны 570 нм. Далее вычисляли процент живых клеток (C_L) по формуле

$$C_L = (A_s - A_m) / (A_c - A_m) \times 100 \%,$$

где A_s – оптическая плотность исследуемого образца, A_c – оптическая плотность контрольного образца, A_m – оптическая плотность среды.

Контрольной группой служили клетки без добавления наночастиц и отдельно с наночастицами серебра и железа, также полученными электрическим взрывом одиночных проволок в атмосфере аргона. Для статистической обработки данных использовались параметрические методы с уровнем достоверности $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При совместном электрическом взрыве серебряной и железной проволок в атмосфере аргона образуются сферические частицы, среднечисленный

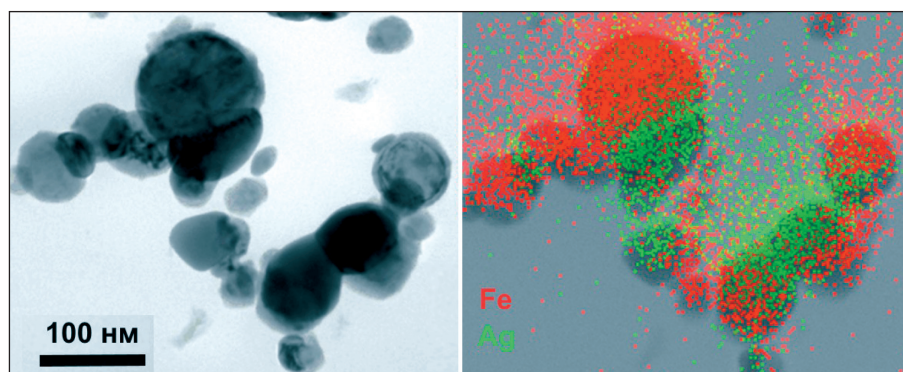


Рис. 1. ПЭМ-изображение наночастиц Ag-Fe

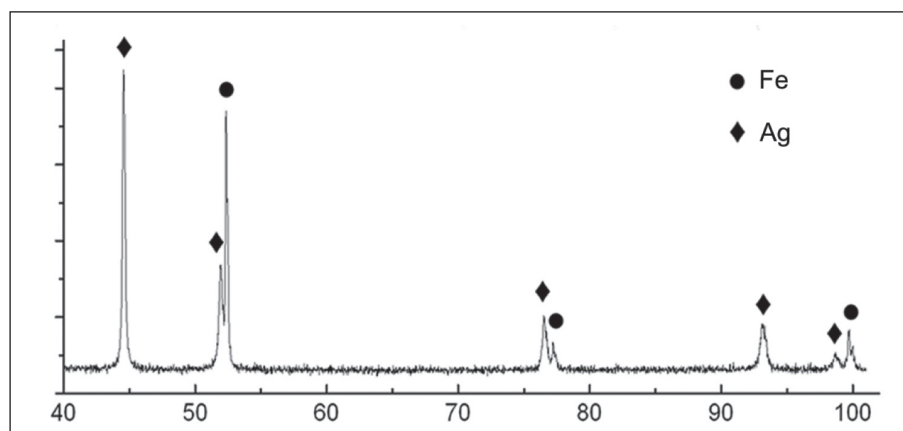


Рис. 2. Дифрактограмма наночастиц Ag-Fe

размер a_n которых составляет 72 нм. Сферическая форма частиц обусловлена механизмом их формирования, которое происходит из жидкой фазы [11]. На ТЕМ-изображениях наночастиц (рис. 1) видно, что независимо от состава наночастиц все они имеют приблизительно одинаковую форму и размер.

При детальном исследовании частиц методом энерго-дисперсионного анализа видно, что серебро и железо неравномерно распределены по частицам. Встречаются участки, обогащенные одним из компонентов с четкими границами разделения фаз. В данном случае формируются «янус»-наночастицы, где серебро и железо четко разделены между собой. На дифрактограмме образца (рис. 2) основные рефлексы соответствуют фазам металлического Ag (PDF № 01–087–0597) и Fe (PDF № 01–071–4648).

Стоит отметить, что отношение высот пиков коррелирует с количественным составом нанопорошка. Смещения основных полос поглощения не наблюдается, что говорит об отсутствии химического взаимодействия между металлами. При этом наличия оксидных фаз не обнаружено, так как они находятся в аморфном состоянии.

Противоопухолевая активность наночастиц Fe/Ag была определена при помощи МТТ-теста на культурах базальных клеток нейробластомы мыши Neuro 2a и гистиоцитарной саркомы мыши J 774.

Как видно из рис. 3, водные суспензии наночастиц отдельных металлов серебра и железа в меньшей степени снижали жизнеспособность клеток по сравнению с биметаллическими наночастицами. Так, наночастицы железа только в концентрации 0,1 мг/мл подавляли 32 % клеток линии J 774 и 35 % клеток линии Neuro 2a. Показано [12], что наночастицы железа оказывают ингибирующее воздействие на рост раковых клеток только в окисленном состоянии в виде оксида. Механизм его действия основан на продуцировании активных форм кислорода [13]. Наночастицы серебра также демонстрируют не очень сильную противоопухолевую активность. Жизнеспособность клеток J 774 снижалась на 51 % после инкубации с 0,1 мг/мл наночастиц Ag. Низкая активность наночастиц, синтезированных при электрическом взрыве, скорее всего, связана с наличием пассивирующего слоя оксидной пленки на поверхности наночастиц и низкой растворимостью металлов. Наибольшую дозозависимую противоопухолевую активность продемонстрировали наночастицы Ag-Fe (рис. 3). Известно, что железо с серебром образуют гальваническую пару, что способствует растворению наночастиц и образованию ионов железа и серебра. Более высокая скорость коррозии биметаллических частиц Ag-Fe по сравнению с монометаллическими наночастицами обусловлена

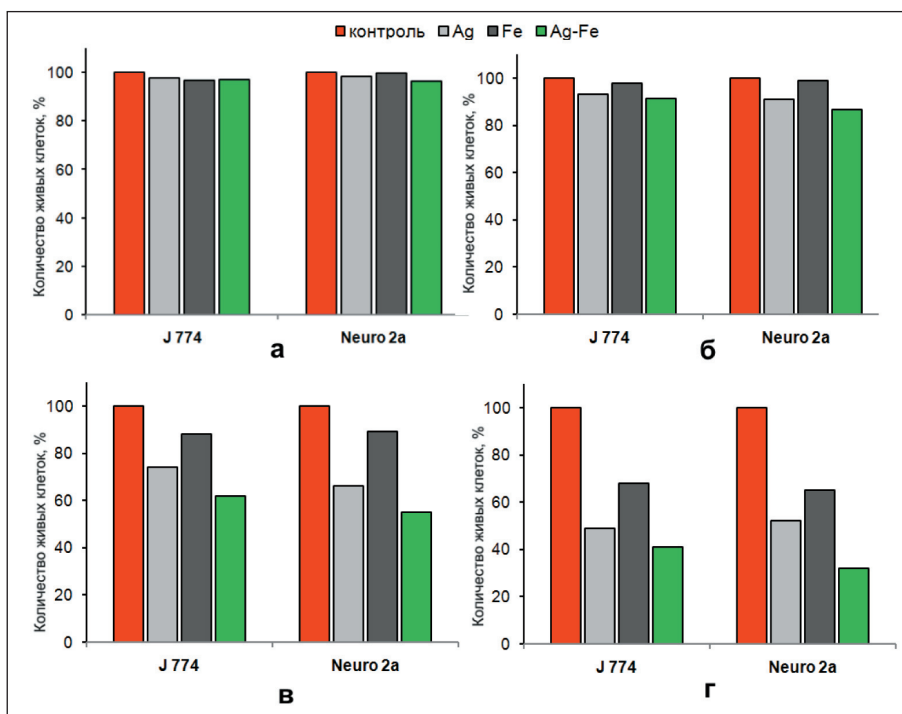


Рис. 3. Количество живых клеток после 24 ч экспозиции с наночастицами в концентрации 0,001 мг/мл (а), 0,01 мг/мл (б), 0,05 мг/мл (в) и 0,1 мг/мл (г)

большей площадью контактов между металлическими фазами в янус-наночастицах, которые определяют большее число центров коррозии в биметаллических наночастицах.

Заключение

В результате электрического взрыва проволок из несмешивающихся металлов железа и серебра

были получены биметаллические наночастицы Ag-Fe со структурой «янус»-частиц. Наночастицы Ag-Fe демонстрируют более высокую противоопухолевую активность, чем отдельные металлы, из которых они состоят, и представляют собой перспективный материал для борьбы с раковыми клетками.

ЛИТЕРАТУРА/REFEREBCES

1. Witte K., Müller K., Grüttner C., Westphal F., Johansson C. Particle size- and concentration-dependent separation of magnetic nanoparticles. *J Magnetism Magnetic Materials*. 2017 Apr; 427 (1): 320–324. doi: 10.1016/j.jmmm.2016.11.006.
2. Sensenig R., Sapir Y., MacDonald C., Cohen S., Polyak B. Magnetic nanoparticle-based approaches to locally target therapy and enhance tissue regeneration in vivo. *Nanomedicine (Lond)*. 2012 Sep; 7 (9): 1425–1442. doi: 10.2217/nmm.12.109.
3. Estelrich J., Sánchez-Martín M.J., Busquets M.A. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *Int J Nanomedicine*. 2015 Mar 6; 10: 1727–41. doi: 10.2147/IJN.S76501.
4. Kayal S., Ramanujan R.V. Anti-Cancer Drug Loaded Iron–Gold Core–Shell Nanoparticles (Fe@Au) for Magnetic Drug Targeting. *J Nanosci Nanotechnol*. 2010 Sep; 10 (9): 5527–39.
5. Medici S., Peana M., Crisponi G., Nurchi V.M., Lachowicz J.I., Remelli M., Zoroddu M.A. Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. *Coord Chem Rev*. 2016 Nov; 327–328: 349–359. doi: 10.1016/j.ccr.2016.05.015.
6. Drake P.L., Hazelwood K.J. Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Ann Occup Hyg*. 2005; 49: 575–585. doi: 10.1093/annhyg/mei019.
7. Medvetz D.A., Hindi K.M., Panzner M.J., Ditto A.J., Yun Y.H., Youngs W.J. Anticancer Activity of Ag(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes Derived from 4,5-Dichloro-1H-Imidazole. *Met Based Drugs*. 2008; 2008: 384010. doi: 10.1155/2008/384010.
8. Franco-Molina M.A., Mendoza-Gamboa E., Sierra-Rivera C.A., Gómez-Flores R.A., Zapata-Benavides P., Castillo-Tello P., Alcocer-González J.M., Miranda-Hernández D.F., Tamez-Guerra R.S., Rodríguez-Padilla C. Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Nov 16; 29: 148. doi: 10.1186/1756-9966-29-148.
9. Johnson N.A., Southerland M.R., Youngs W.J. Developments in the Medicinal Applications of Silver-NHC Complexes and Imidazolium Salts. *Molecules*. 2017 Jul 27; 22 (8). pii: E1263. doi: 10.3390/molecules22081263.
10. Rosman R., Saifullah B., Maniam S., Dorniani D., Hussein M.Z., Fakurazi S. Improved Anticancer Effect of Magnetite Nanocomposite Formulation of GALLIC Acid (Fe₃O₄-PEG-GA) Against Lung, Breast and Colon Cancer Cells. *Nanomaterials (Basel)*. 2018 Feb 2; 8 (2). pii: E83. doi: 10.3390/nano8020083.
11. Lerner M.I., Pervikov A.V., Glazkova E.A., Svarovskaya N.V., Lozhkomoev A.S., Psakhie S.G. Structures of binary metallic nanoparticles produced by electrical explosion of two wires from immiscible elements. *Powder Technology*. 2016; 288: 371–378. doi: 10.1016/j.powtec.2015.11.037.
12. Thoidingjam S., Tiku A.B. New developments in breast cancer therapy: role of iron oxide nanoparticles. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2017. 8: 023002. doi: 10.1088/2043-6254/aa5e33.
13. Patil R.M., Thorat N.D., Shete P.B., Bedge P.A., Gavde S., Joshi M.G., Tofail S.A.M., Bohara R.A. Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochem Biophys Rep*. 2018 Jan 8; 13: 63–72. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.12.002.

Поступила/Received 10.10.18
Принята в печать/Accepted 11.11.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бакина Ольга Владимировна, кандидат химических наук, научный сотрудник, Институт физики прочности и материаловедения, Сибирское отделение Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 9002-1344. E-mail: ovbakina@ispms.tsc.ru.

Первиков Александр Васильевич, кандидат технических наук, младший научный сотрудник, Институт физики прочности и материаловедения, Сибирское отделение Российской академии наук (г. Томск, Россия).

Глазкова Елена Алексеевна, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, Институт физики прочности и материаловедения, Сибирское отделение Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 9642-186.

Сваровская Наталья Валентиновна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Институт физики прочности и материаловедения, Сибирское отделение Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 3019-7455.

Ложкомоев Александр Сергеевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Институт физики прочности и материаловедения, Сибирское отделение Российской академии наук (г. Томск, Россия).

Лернер Марат Израильевич, доктор технических наук, заведующий лабораторией, Институт физики прочности и материаловедения, Сибирское отделение Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 3247-9864.

Августинovich Александра Владимировна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением, Консультативно-диагностический центр с поликлиникой управления делами Президента Российской Федерации (г. Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код: 2952-6119.

Финансирование

Наночастицы были получены и охарактеризованы при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-19-01319). Цитотоксичность наночастиц была изучена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Olga V. Bakina, PhD, Researcher, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: ovbakina@ispms.tsc.ru.

Alexandr V. Pervikov, PhD, Junior Researcher, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

Elena A. Glazkova, PhD, Senior Researcher, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

Natalia V. Svarovskaya, PhD, Senior Researcher, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

Alexandr S. Lozhkomev, PhD, Senior Researcher, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

Marat I. Lerner, DSc, Head of Laboratory, Institute of Strength Physics and Materials Science, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia).

Alexandra V. Avgustinovich, MD, PhD, Head of Department, Consultative and Diagnostic Center of the Administration of the President of the Russian Federation (St. Petersburg, Russia).

Funding

Nanoparticles were obtained and characterized with the financial support of the Russian Science Foundation (Grant No. 17-19-01319). The cytotoxicity of nanoparticles was studied in the framework of the Program of Basic Scientific Research of the State Academies of Sciences for 2013–2020.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Для цитирования: Киреева Г.С., Беляева О.А., Сенчик К.Ю., Беспалов В.Г., Стуков А.Н., Губарева Е.А., Майдин М.А. Асцитная опухоль яичников у крыс – адекватная доклиническая модель канцероматоза для изучения интраперитонеального химиоперфузионного лечения. Современное состояние вопроса. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 71–78. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-71-78.

For citation: Kireeva G.S., Belyaeva O.A., Senchik K.Y., Bepalov V.G., Stukov A.N., Gubareva E.A., Maydin M.A. Ascitic ovarian cancer is an adequate preclinical model of carcinomatosis to study intraperitoneal chemoperfusion treatment. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 71–78. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-71-78.

АСЦИТНАЯ ОПУХОЛЬ ЯИЧНИКОВ У КРЫС – АДЕКВАТНАЯ ДОКЛИНИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КАНЦЕРОМАТОЗА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИНТРАПЕРИТОНЕАЛЬНОГО ХИМИОПЕРФУЗИОННОГО ЛЕЧЕНИЯ

Г.С. Киреева, О.А. Беляева, К.Ю. Сенчик, В.Г. Беспалов, А.Н. Стуков,
Е.А. Губарева, М.А. Майдин

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Россия
Россия, г. Санкт-Петербург, 197758, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68. E-mail: galinakireyeva@mail.ru

Аннотация

Введение. Изучение механизмов, лежащих в основе эффектов интраперитонеальной химиоперфузии, а также разработка оптимальных режимов и методик химиоперфузии требуют животной модели перитонеального канцероматоза, близкой по своим характеристикам к картине перитонеального канцероматоза у человека. В связи с этим авторами данного исследования была описана, охарактеризована и апробирована модель перитонеального канцероматоза у крыс с асцитной опухолью яичников, предназначенная для изучения интраперитонеальной химиоперфузии. **Материал и методы.** Были сформированы 3 группы крыс с асцитной опухолью яичника: 1 – контроль (без лечения), n=15; 2 – нормотермическая интраперитонеальная химиоперфузия с цисплатином, 40 мг/кг, n=12; 3 – гипотермическая интраперитонеальная химиоперфузия с цисплатином, 20 мг/кг, n=14. Все животные подвергались эвтаназии с последующей аутопсией при достижении критериев эвтаназии, установленных в протоколе исследования. **Результаты.** Прививаемость асцитной опухоли яичников составила 100 %. Медиана общей выживаемости крыс контрольной группы составила 9,5 дней. На вскрытии у всех крыс данной группы регистрировали асцит, а у крыс, проживших 15–17 дней, регистрировали опухолевые узлы белого цвета размерами 1–3 мм в наибольшем измерении в большом сальнике, брыжейке кишечника, на париетальной и висцеральной брюшине, гистологически верифицированные как метастазы низкодифференцированной опухоли яичника. У двух и пяти крыс в группах 2 и 3 соответственно регистрировались метастазы опухоли яичников в паратрахеальных лимфатических узлах и опухолевый гидроторакс при отсутствии признаков перитонеального канцероматоза. Медиана общей выживаемости крыс в группах 2 и 3 составила 37,5 и 25,5 дней (p=0,256) соответственно, что было достоверно выше по сравнению с контрольной группой. **Заключение.** По результатам экспериментов *in vivo* локализация асцитной опухоли яичников, 100 % прививаемость штамма, быстрое развитие асцита и опухолевое поражение брюшной полости делают асцитную опухоль яичников у крыс адекватной доклинической моделью перитонеального канцероматоза для изучения интраперитонеального химиоперфузионного лечения. Причины и механизмы развития опухолевого гидроторакса после проведения интраперитонеальной химиоперфузии на данной модели подлежат дальнейшему изучению.

Ключевые слова: асцитная опухоль яичников, перитонеальный канцероматоз, интраперитонеальная химиоперфузия, доклиническая модель, цисплатин, крысы, выживаемость.

ASCITIC OVARIAN CANCER IS AN ADEQUATE PRECLINICAL MODEL OF CARCINOMATOSIS TO STUDY INTRAPERITONEAL CHEMOPERFUSION TREATMENT

G.S. Kireeva, O.A. Belyaeva, K.Y. Senchik, V.G. Beshpalov, A.N. Stukov, E.A. Gubareva, M.A. Maydin

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Russian Ministry of Health, Saint-Petersburg, Russia
68, Leningradskaya Street, 197758-Saint-Petersburg, Russia. E-mail: galinakireyeva@mail.ru

Abstract

Background. To study the mechanisms underlying the effects of intraperitoneal chemoperfusion and to develop the optimal chemoperfusion regimen, an animal model of peritoneal carcinomatosis closely resembles a human model of peritoneal carcinomatosis is required. In our study, the model of peritoneal carcinomatosis in rats with ascitic ovarian cancer was used. **Material and Methods.** There were three groups of rats with ascitic ovarian cancer: 1 – the control group (n=15) having no treatment; 2 – rats receiving normothermic intraperitoneal chemoperfusion with cisplatin, 40 mg/kg (n=12); 3 – rats receiving hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion with cisplatin, 20 mg/kg (n=14). All animals were euthanized with subsequent autopsy. **Results.** Ascitic ovarian cancer developed in 100 % of the animals injected with the tumor cells. The median overall survival of rats in the control group was 9.5 days. At autopsy, all rats had ascites, and rats surviving 15–17 days after the tumor cell injection had white tumor nodes measuring 1–3 mm in the greater omentum, intestinal mesentery, parietal and visceral peritoneum. The nodes were histologically verified as metastases of low-differentiated ovarian tumor. In 2 and 5 rats from groups 2 and 3 respectively, metastases in paratracheal lymph nodes and tumor hydrothorax were detected with no evidence of peritoneal carcinomatosis. The median survival of rats in groups 2 and 3 was significantly higher than that in the control group, being 37.5 and 25.5 months, respectively (p=0,256). **Conclusion.** This in vivo study proved that localization of ascitic ovarian tumor, development of the tumor in all animals injected with tumor cells, fast ascites progression and peritoneal carcinomatosis make this ascitic ovarian cancer an adequate preclinical model of peritoneal carcinomatosis to study intraperitoneal chemoperfusion. Further studies are needed to understand the reasons and mechanisms of the tumor hydrothorax development in rats after intraperitoneal chemoperfusion.

Key words: ascitic ovarian cancer, peritoneal carcinomatosis, intraperitoneal chemoperfusion, preclinical model, cisplatin, rats, survival.

Введение

Интраперитонеальная химиоперфузия (ИПХП) – высокотехнологичный вариант интраперитонеальной химиотерапии, который в сочетании с циторедуктивной операцией применяется в лечении пациентов с перитонеальным канцероматозом [1]. Данная технология рассматривается в качестве стандарта лечения псевдомиксомы брюшины, злокачественной мезотелиомы брюшины и перитонеального канцероматоза при колоректальном раке (для данной локализации химиоперфузия включена в обновленные рекомендации NCCN по лечению метастатических форм колоректального рака от 2017 г., при соблюдении ряда условий) [2, 3]. У пациентов с перитонеальным канцероматозом при раке желудка и раке яичников роль химиоперфузии остается спорной из-за противоречивых результатов разных исследований и нехватки рандомизированных клинических исследований [4, 5]. Так, только в 2018 г. были опубликованы результаты первого масштабного рандомизированного исследования (246 больных), в котором добавление ИПХП к циторедуктивной операции

у пациенток с перитонеальным канцероматозом при впервые диагностированном раке яичников достоверно увеличивало медиану безрецидивной выживаемости с 10,7 до 14,2 мес, а медиану общей выживаемости – с 33,9 до 45,7 мес [6]. Наряду с этим имеются данные исследований, в которых проведение химиоперфузии при перитонеальном канцероматозе не влияло на исход лечения [7].

Сложившаяся ситуация серьезно осложняет широкое внедрение химиоперфузионных технологий в клиническую практику, несмотря на их очевидный лечебный потенциал. Отсутствие полноценных доклинических исследований ИПХП привело к тому, что фундаментальные основы химиоперфузионного лечения злокачественных опухолей до сих пор мало изучены. С практической точки зрения это обуславливает большой разброс в режимах (температура, лекарственный препарат и его доза, время) и методиках выполнения внутрибрюшинной химиоперфузии в разных центрах, а также различные протоколы периоперационного ведения больных, у которых выполняется химиоперфузия, поскольку не доказано преимущества ни одной из методик [7].

Изучение химиоперфузии как метода лечения с точки зрения изменений, происходящих в организме во время и после ИПХП, и их влияния на исход лечения перитонеального канцероматоза, особенностей фармако- и токсикокинетики различных противоопухолевых препаратов при химиоперфузионном введении, а также поиск оптимальных режимов внутрибрюшинной химиоперфузии требуют адекватной доклинической модели перитонеального канцероматоза. В данной статье авторы описывают модель перитонеального канцероматоза у крыс с асцитной опухолью яичников и обосновывают рациональность ее использования для изучения интраперитонеальной химиоперфузии.

Материал и методы

Исследование было проведено в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, использующихся в экспериментальных и прочих научных целях (Страсбург, 1986). Была использована 41 крыса-самка Вистар (Питомник лабораторных животных «Рапполово»).

Поскольку выполнение интраперитонеальной химиоперфузии на мышах – крайне трудоемкая и не вполне оправданная задача из-за малых размеров этих животных, необходимо было подобрать крысиную опухоль, которая бы приводила к развитию перитонеального канцероматоза. Нами была выбрана асцитная опухоль яичников крыс (банк опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России), которая по своему описанию могла быть использована для достижения поставленной цели. Данная опухоль была получена Е.Е. Погосянц, Е.Л. Пригожиной и И.Л. Еголиной в 1958 г. от одной из крыс Вистар, матери которых получали во время беременности и лактации большие дозы 7,12-диметилбенз[α]антрацена. Опухоль характеризовалась обширным метастазированием по брюшине и в сальник, которое сопровождалось развитием асцита. Гистологически опухоль являлась папиллярной аденокарциномой, а метастазы имели строение аденокарциномы. Продолжительность жизни животных после перевивки составляла 25–35 дней [8]. Отметим, что данная опухоль яичников использовалась другими авторами в экспериментальных исследованиях по различной тематике [9–11], но никогда ранее не рассматривалась как модель для изучения интраперитонеальной химиотерапии.

Для моделирования перитонеального канцероматоза осуществляли внутрибрюшинную (в/б) перевивку опухоли яичников. После предварительного пассажа на 7-й день после в/б перевивки опухоли яичников от одной крысы забирали асцит, который перевивали здоровым крысам в/б. Асцитическую жидкость, содержащую необходимое для развития перитонеального карциноматоза число

опухолевых клеток, получали следующим образом: у крысы-опухоленосителя отбирали асцитическую жидкость, затем готовили разведение асцита в соотношении 1:4 – к 1 мл асцита добавляли 3 мл 0,9 % физиологического раствора (разведение 1). Разведение 1 использовали для перевивки здоровым крысам. Подсчет опухолевых клеток проводили в камере Горяева, для чего использовали разведение 2 (0,2 мл разведения 1 + 3,8 мл 0,3 % уксусной кислоты). Для окончательного расчета использовали формулы:

$$\begin{aligned} A \times 2 \times 100 &= B, \\ B \times 1000 &= n \times 10^7 \text{ в } 0,5 \text{ мл}, \end{aligned}$$

где А – сосчитанное в камере Горяева число опухолевых клеток, В – число опухолевых клеток в 1 мкл (мм³).

Для того чтобы у крыс развивался перитонеальный карциноматоз, необходимо было вводить внутрибрюшинно 1×10^7 клеток опухоли яичников в 0,5 мл разведенного асцита (разведение 1). Поскольку асцитическая жидкость, взятая у разных крыс, отличалась по количеству опухолевых клеток, при каждой перевивке производили пересчет объема разведения 1, но число вводимых опухолевых клеток (1×10^7) оставалось постоянным.

Для макро- и микроскопической характеристики разработанной модели перитонеального карциноматоза опухоль яичников была перевита 15 крысам (группа 1 – контрольная). При достижении критериев эвтаназии (полная анорексия в течение 24 ч, признаки кахексии, слабость/невозможность получения корма или воды) животные подвергались эвтаназии углекислым газом. Для цитологического исследования на 7-й день после перевивки опухоли у всех крыс контрольной группы забирали асцитическую жидкость, из которой делали мазок и подвергали стандартной цитологической обработке с окраской гематоксилином и водно-спиртовым раствором эозина. Для гистологического исследования образцы внутрибрюшинных опухолевых узлов отбирались при аутопсии после эвтаназии.

Наряду с контрольной группой были сформированы 2 группы крыс с опухолью яичников, в которых выполнялись интраперитонеальные химиоперфузии: группа 2 – нормотермическая интраперитонеальная химиоперфузия с цисплатином, 40 мг/кг (n=12); группа 3 – гипертермическая интраперитонеальная химиоперфузия с цисплатином, 20 мг/кг (n=14). Химиоперфузия проводилась на второй день после перевивки опухоли яичников по методике, описанной ранее [12]. После лечения животные находились под наблюдением и при достижении критериев эвтаназии, описанных выше, подвергались эвтаназии углекислым газом с последующей аутопсией. Продолжительность жизни животных рассчитывалась как время от дня перевивки до дня эвтаназии.

Результаты

Макро- и микроскопическая характеристика модели перитонеального канцероматоза (группа I, контрольная)

Прививаемость асцитной опухоли яичников составила 100 %. Опухоль быстро прогрессировала, приводя к развитию перитонеального карциноматоза, асцита (рис. 1, 2) и гибели крыс на 9–17-й дни после перевивки. На вскрытии регистрировали опухолевый асцит (от умеренного до выраженного), который в 90 % случаев был



Рис. 1. Макроскопическая картина асцита у крысы после перевивки опухоли яичника

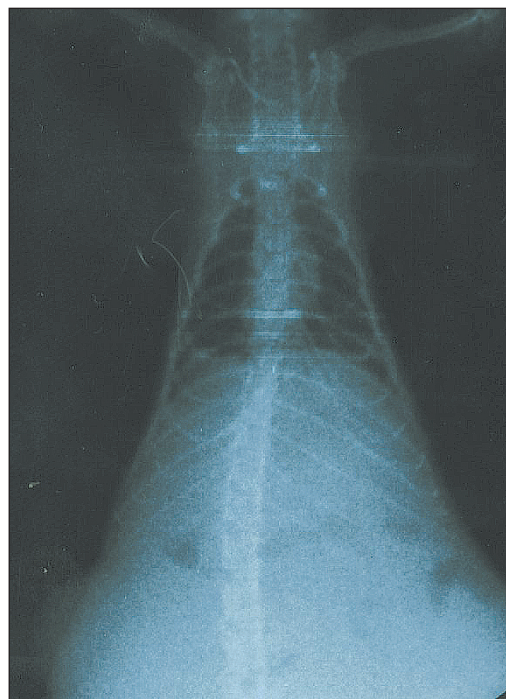


Рис. 2. Рентгеновский снимок. Асцит у крысы с опухолью яичника. Светлая область на снимке – асцитическая жидкость

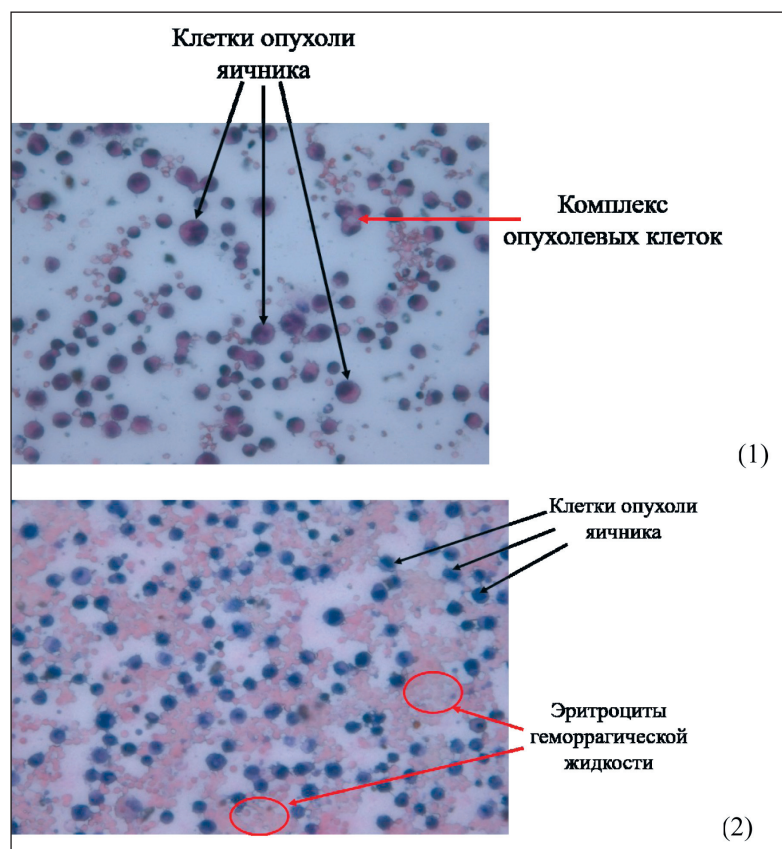


Рис. 3. Микрофото. Цитологический препарат. Клетки низкодифференцированной опухоли яичника в асцитической (1) и геморрагической асцитической (2) жидкости. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

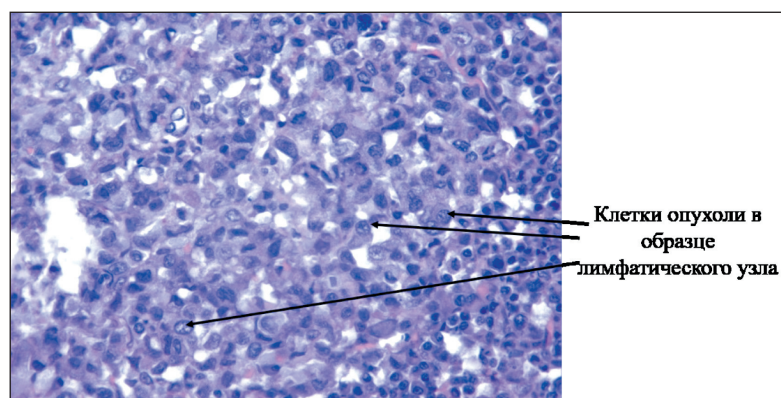


Рис. 4. Микрофото. Гистологический препарат. Метастазы низкодифференцированной опухоли яичника в мезентериальный лимфатический узел. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

геморрагическим. У крыс, проживших 15–17 дней, отмечали опухолевые узлы белого цвета, размерами 1–3 мм в наибольшем измерении, в большом сальнике, брыжейке кишечника, на париетальной и висцеральной брюшине.

При цитологическом исследовании мазков асцитической жидкости опухолевые клетки в асците представлялись крупными, гиперхромными, округлыми, с крупным оптически плотным ядром и резко базофильной цитоплазмой (рис. 3). Количество вакуолей в цитоплазме варьировало в разных клетках, а на поверхности цитоплазмы крупных клеток имелись базофильные выступы. В некоторых участках опухолевые клетки асцитической жидкости образовывали комплексы из 2–5 клеток, что является характерным для аденокарцином. С учетом происхождения опухоль является низкодифференцированным эпителиальным раком яичников. Гистологическое исследование карциноматозных узлов, взятых из париетальной брюшины, и пораженных мезентериальных лимфатических узлов (рис. 4) позволило диагностировать метастазы опухоли яичников.

Результаты интраперитонеальной химиоперфузии на модели перитонеального канцероматоза у крыс с асцитной опухолью яичников

Медиана общей выживаемости крыс с опухолью яичников в контрольной группе составила 9,5 дней, тогда как выполнение нормо- и гипертермической интраперитонеальной химиоперфузии с цисплатином существенно увеличивало значение данного показателя до 37,5 и 25,5 дней соответственно (табл. 1). Значимых различий в выживаемости крыс с асцитной опухолью яичников, у которых выполнялись нормо- и гипертермическая интраперитонеальные химиоперфузии, не было.

По результатам аутопсии в контрольной группе распространение опухолевого процесса в пределах брюшной полости регистрировалось у 15 (100 %) крыс. В группах 2 и 3 распространение опухолевого процесса в пределах брюшной полости регистрировалось не у всех животных (табл. 2), а только у 10 (83 %) крыс, получавших нормотермическую интраперитонеальную химиоперфузию с цисплатином (группа 2) и у 8 (57 %) крыс, получавших

Таблица 1

Выживаемость крыс с асцитной опухолью яичников в исследуемых группах

Группа	Число крыс	Медиана общей выживаемости, дни	95 % ДИ для медианы общей выживаемости, дни	p
1. Контроль	15	9,5	8–23	–
2. Нормотермическая интраперитонеальная химиоперфузия с цисплатином	12	37,5	20–58	$>0,001^1$
3. Гипертермическая интраперитонеальная химиоперфузия с цисплатином	14	25,5	13–62	$0,003^1$ $0,256^2$

Таблица 2

Результаты аутопсии крыс с опухолью яичника, у которых выполнялось внутрибрюшинное химиоперфузионное лечение

Группа	Число крыс	Перитонеальный канцероматоз	Опухолевый гидроторакс	Канцероматоз + гидроторакс
1. Контроль	15	15 (100 %)	–	–
2. Нормотермическая интраперитонеальная химиоперфузия с цисплатином	12	10 (83 %)	2 (17 %)	–
3. Гипертермическая интраперитонеальная химиоперфузия с цисплатином	14	8 (57 %)	5 (36 %)	1 (7 %)

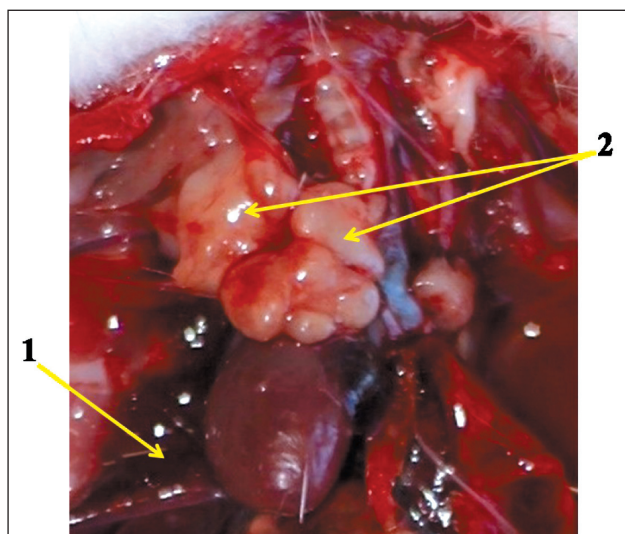


Рис. 5. Геморрагический гидроторакс (1) и метастатическое распространение опухоли яичника в паратрахеальные лимфатические узлы (2)

гипертермическую интраперитонеальную химиоперфузию с цисплатином (группа 3). У животных данных групп, проживших 20 дней и более, на вскрытии регистрировали многочисленные опухолевые узлы белого цвета, размерами 1–5 мм в наибольшем измерении, в большом сальнике, брыжейке кишечника, параметральной клетчатке, по париетальной и висцеральной брюшине. Отмечали опухолевое поражение обоих яичников. Солидные опухоли в виде белой творожистой массы, размерами 10–20 мм в наибольшем измерении, развивались в пространстве между диафрагмой и печенью, печенью и желудком.

У 2 (группа 2) и 5 (группа 3) животных соответственно развилась выраженная дыхательная недостаточность, вызванная развитием опухолевого гидроторакса, при отсутствии признаков опухолевого поражения брюшной полости. В плевральной полости у этих животных скапливался геморрагический экссудат (5–8 мл), на месте паратрахеальных и медиастинальных лимфатических узлов находились метастатические узлы белорозового цвета 5–8 мм в наибольшем измерении (рис. 5). У одной крысы в группе 3 на аутопсии было отмечено опухолевое поражение брюшной и грудной полостей.

Обсуждение

Экспериментальная модель перитонеального канцероматоза у крыс с асцитной опухолью яичников является воспроизводимой и адекватной для изучения интраперитонеальной химиоперфузии и имеет ряд преимуществ перед существующими ксенографтными моделями местнораспространенного рака яичников (РЯ). В настоящее время животных моделей, которые бы воспроизводили клиническую картину РЯ человека, очень мало.

Большинство из используемых моделей – это экспериментальные РЯ у мышей [13], которые неудобны для исследования химиоперфузионного лечения. Более того, наиболее часто в литературе встречаются ксенографтные модели, для создания которых линии клеток РЯ человека вводятся иммунодефицитным животным. Самыми распространенными клеточными линиями, используемыми для моделирования рака яичников, являются IGR-OV1, NIH:OVCAR-3 и SKOV-3 [14]. Данные ксенографтные модели не являются идеальными, поскольку нельзя предполагать, что взаимодействия между опухолью и окружающей средой в организме животного будут такие же, как в организме человека. Несмотря на то, что ксенографтные модели человеческой опухоли широко используются для оценки потенциальной эффективности лекарственных препаратов в доклинических исследованиях, их прогностическое значение невелико [15]. Кроме того, большинство ксенографтных моделей отличаются плохой воспроизводимостью и малым потенциалом для перевивки *in vivo* [16].

Использованная нами опухоль яичников с учетом происхождения является низкодифференцированным эпителиальным раком яичников. Опухоль прививалась в 100 % случаев. Также данный штамм опухоли яичников интересен в отношении локализации и морфологии исходной опухоли. По своей морфологии и течению (характер метастазирования, накопление асцита) асцитная опухоль яичников весьма близка соответствующим опухолям человека. Легкость, с которой асцитная опухоль яичников перешла при внутрибрюшинной перевивке в асцитную форму, возможно, связана с общей склонностью опухолей яичника, как это хорошо известно из клинической практики, к образованию асцита с развивающимися в нем опухолевыми клетками.

Установлено, что для данной опухоли характерно метастазирование в паратрахеальные лимфоузлы, что отличает ее от существующих ксенографтных моделей. У нескольких крыс с асцитной опухолью яичников, получавших химиоперфузионное лечение (нормотермическое или гипертермическое), отмечено развитие опухолевого гидроторакса, который не регистрировался у крыс контрольной группы, очевидно, в силу того, что они погибали от осложнений перитонеального канцероматоза, не доживая до диссеминации опухоли в органы грудной полости. В клинической практике респираторные осложнения комбинации циторедуктивной операции и интраперитонеальной химиоперфузии являются вторыми по частоте после осложнений со стороны желудочно-кишечного тракта [17]. У пациентов могут развиваться ателектаз, отек легких, пневмония, плевральный выпот и пневмоторакс. А.Е. Canda et al. проанализировали осложнения 118 интраперитонеальных химиоперфузий, выполнен-

ных у 115 больных с перитонеальным канцероматозом, причем почти у половины из них (44,9 %) причиной развития канцероматоза был рак яичников; плевральный выпот был зарегистрирован у 4 пациентов, пневмоторакс – у одного [18].

Проведение нормо- и гипертермической интраперитонеальных химиоперфузий с цисплатином у крыс с асцитной опухолью яичников достоверно увеличивало выживаемость животных по сравнению с контрольной группой крыс, не получавших лечения, что также подтверждает рациональность использования описанной модели перитонеального канцероматоза для изучения химиоперфузионного лечения.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Morano W.F., Khalili M., Chi D.S., Bowne W.B., Esquivel J. Clinical studies in CRS and HIPEC: Trials, tribulations, and future directions. A systematic review. *J Surg Oncol.* 2018 Feb; 117 (2): 245–259. doi: 10.1002/jso.24813.
2. Sugarbaker P.H. Revised clinical pathway for the management of peritoneal metastases from colorectal cancer using NCCN 2017 guidelines. *Colorectal Cancer.* 2017. Dec; 6 (3): 75–82. doi: 10.2217/crc-2017-0016.
3. Sugarbaker P.H. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of gastrointestinal cancers with peritoneal metastases: Progress toward a new standard of care. *Cancer Treat Rev.* 2016. Jul; 48: 42–9. doi: 10.1016/j.ctrv.2016.06.007.
4. Neuwirth M.G., Alexander H.R., Karakousis G.C. Then and now: cytoreductive surgery with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC), a historical perspective. *J Gastrointest Oncol.* 2016. Feb; 7 (1): 18–28. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.106.
5. Степанов И.В., Падерев Ю.М., Афанасьев С.Г. Перитонеальный канцероматоз. *Сибирский онкологический журнал.* 2014; 5: 45–53. [Stepanov I.V., Paderov Yu.M., Afanasyev S.G. Peritoneal carcinomatosis. *Siberian Journal of Oncology.* 2014; 5: 45–53. (in Russian)].
6. Van Driel W.J., Koole S.N., Sikorska K., van Leeuwen J.H.S., Schreuder H.W.R., Hermans R.H.M., de Hingh I.H.J.T., van der Velden J., Arts H.J., Massuger L.F.A.G., Aalbers A.G.I., Verwaal V.J., Kieffer J.M., Van de Vijver K.K., van Tinteren H., Aaronson N.K., Sonke G.S. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2018. Jan; 378: 230–240. doi: 10.1056/NEJMoa1708618.
7. Spiliotis J., Halkia E., de Bree E. Treatment of peritoneal surface malignancies with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy – current perspectives. *Curr Oncol.* 2016. Jun; 23 (3): e266–75. doi: 10.3747/co.23.2831.
8. Позогянц Е.Е., Пригожина Е.Л., Егорова Н.А. Перевиваемая опухоль яичника крысы. Вопросы онкологии. 1962; 11: 29–36. [Pogozhyants Ye.Ye., Prigozhina Ye.L., Yegolina N.A. Transplanted ovarian rat tumor. *Problems in Oncology.* 1962; 11: 29–36. (in Russian)].
9. Трашков А.П., Панченко А.В., Васильев А.Г., Артеменко М.Р., Богомолов Б.Н. Особенности роста экспериментальной асцитной опухоли яичников крыс и изменение гематологических показателей у животных-опухоленосителей под действием гемцитабина. *Вестник Российской военно-медицинской академии.* 2012; 2 (38): 90–96. [Trashkov A.P., Panchenko A.V., Vasiliev A.G., Artemenko M.R., Bogomolov B.N. Experimental rodent ascitic ovarian tumor growth peculiarities and hemocytabin effects upon hematological parameters in rats with tumor. *Herald of Russian military medical Academy.* 2012; 2 (38): 90–96. (in Russian)].
10. Тузеева А.Ю., Долгова Д.Р., Абакумова Т.В., Сенина Д.Н. Изучение про- и антиоксидантного статуса эритроцитов при прогрессировании экспериментального рака яичников. *Фундаменталь-*

Заключение

По результатам экспериментов *in vivo*, локализация исходной опухоли яичников, 100 % прививаемость штамма, быстрое развитие асцита и опухолевое поражение брюшной полости делают асцитную опухоль яичников у крыс адекватной доклинической моделью перитонеального канцероматоза для изучения интраперитонеального химиоперфузионного лечения. Выполнение химиоперфузий на данной модели оказывает выраженный лечебный эффект, увеличивая общую выживаемость крыс по сравнению с контрольной группой.

ные исследования. 2014; 12–1: 145–149. [Tuzeeva A.Y., Dolgova D.R., Abakumova T.V., Senina D.N. Study pro and antioxidant status of erythrocytes in the progression of experimental ovarian cancer. *Fundamental research.* 2014; 12–1: 145–149. (in Russian)].

11. Соболев И.В., Семенов А.Л., Глушаков Р.И., Беспалов В.Г., Багатурян Г.О., Прошин С.Н., Тапильская Н.И. Лекарственное моделирование тиреоидного статуса и длительность жизни крыс с перевитой асцитной опухолью яичника. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2017; 80 (5): 16–21. [Sobolev I.V., Semenov A.L., Glushakov R.I., Bepalov V.G., Bagaturiya G.O., Proshin S.N., Tapil'skaya N.I. Drug Altered Thyroid Status and Survival Life of Rats with Ovarian Tumor Xenografts. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology.* 2017; 80 (5): 16–21. (in Russian)].

12. Беляева О.А., Беспалов В.Г., Сенчик К.Ю., Киреева Г.С., Стуков А.Н., Аристова В.А., Иванцов А.О., Вышинская Е.А., Майдин М.А., Семенов А.Л., Александров В.А., Беляев А.М. Экспериментальная технология химиоперфузионного лечения канцероматоза брюшной полости при раке яичника. *Вопросы онкологии.* 2014; 60 (1): 71–78. [Belyaeva O.A., Bepalov V.G., Senchik K.Yu., Kireeva G.S., Stukov A.N., Aristova V.A., Ivantsov A.O., Vyshinskaya E.A., Maidin M.A., Semenov A.L., Alexandrov V.A., Belyaev A.M. Experimental technology of chemoperfusion treatment for abdominal carcinomatosis in ovarian cancer. 2014; 60 (1): 71–78. (in Russian)].

13. Han X., Papadopoulos A.J., Jones T.A., Sheer D., Raju K.S. SR8: the establishment and characterisation of a new ovarian carcinoma cell line and xenograft model. *Eur J Cancer.* 1996 Jan; 32 A(1): 160–7.

14. Berns E.M., Bowtell D.D. The changing view of high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res.* 2012 Jun 1; 72 (11): 2701–4. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3911.

15. Kerbel R.S. Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. *Cancer Biol Ther.* 2003. Jul-Aug; 2 (4 Suppl 1): S134–9.

16. Friedlander M.L., Russell P., Taylor I.W., Tattersall M.H.N. Ovarian tumour xenografts in the study of the biology of human epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer.* 1985. Mar; 51 (3): 319–333.

17. Baratti D., Kusamura S., Laterza B., Balestra M.R., Deraco M. Early and long-term postoperative management following cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *World J Gastrointest. Oncol.* 2010. Jan 15; 2 (1): 36–43. doi: 10.4251/wjgo.v2.i1.36.

18. Canda A.E., Sokmen S., Terzi C., Arslan C., Oztup I., Karabulut B., Ozzeybek D., Sarioglu S., Fuzun M. Complications and toxicities after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2013 Apr; 20 (4): 1082–7. doi: 10.1245/s10434-012-2853-x.

Поступила/Received 09.10.18
Принята в печать/Accepted 28.12.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Киреева Галина Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научной лаборатории канцерогенеза и старения, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). E-mail: galinakireyeva@mail.ru. Researcher ID (WOS): H-6963-2016. Author ID (Scopus): 56184283000. ORCID: 0000-0002-4732-5895.

Беляева Олеся Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). Author ID (Scopus): 54993582100.

Сенчик Константин Юрьевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник научного отделения общей онкологии и урологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). Author ID (Scopus): 55458924100.

Беспалов Владимир Григорьевич, доктор медицинских наук, заведующий научной лабораторией химиопрофилактики рака и онкофармакологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). Author ID (Scopus): 7101645144.

Стуков Александр Николаевич, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). Author ID (Scopus): 7004016508.

Губарева Екатерина Александровна, научный сотрудник научной лаборатории канцерогенеза и старения, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). Author ID (Scopus): 56909987000.

Майдин Михаил Александрович, научный сотрудник научной лаборатории канцерогенеза и старения, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). Author ID (Scopus): 56184141100.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-75-10017).

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Galina S. Kireeva, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Carcinogenesis, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Russian Ministry of Health (Saint-Petersburg, Russia). E-mail: galinakireyeva@mail.ru. Researcher ID (WOS): H-6963-2016. Author ID (Scopus): 56184283000. ORCID: 0000-0002-4732-5895.

Olesya A. Belyaeva, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Russian Ministry of Health (Saint-Petersburg, Russia). Author ID (Scopus): 54993582100.

Konstantin Yu. Senchik, MD, PhD, Leading Researcher, Department of General oncology and Urology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Russian Ministry of Health (Saint-Petersburg, Russia). Author ID (Scopus): 55458924100.

Vladimir G. Bespalov, MD, PhD, Head of the Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Russian Ministry of Health (Saint-Petersburg, Russia). Author ID (Scopus): 7101645144.

Alexandr N. Stukov, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Innovative Methods of Therapeutic Oncology and Rehabilitation, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Russian Ministry of Health (Saint-Petersburg, Russia). Author ID (Scopus): 7004016508.

Ekaterina A. Gubareva, Researcher, Laboratory of Carcinogenesis and Aging, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Russian Ministry of Health (Saint-Petersburg, Russia). Author ID (Scopus): 56909987000.

Mikhail A. Maidin, Researcher, Laboratory of Carcinogenesis and Aging, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology of the Russian Ministry of Health (Saint-Petersburg, Russia). Author ID (Scopus): 56184141100.

Funding

The study was supported by the grant of the Russian Science Foundation (project № 18-75-10017).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Для цитирования: Боровская Т.Г., Полуэктова М.Е., Вычужанина А.В., Щемерова Ю.А., Гольдберг В.Е. Фармакологическая коррекция патологических изменений у жизнеспособного потомства крыс, вызванных цитостатическим воздействием на стадии прогенеза. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 79–85. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-79-85.

For citation: Borovskaya T.G., Poluektova M.E., Vychuzhanina A.V., Shchemerova Yu.A., Goldberg V.E. Pharmacological correction of pathological changes in the viable offspring of rats, caused by cytostatic impact at the stage of progenesis. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 79–85. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-79-85.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ У ЖИЗНЕСПОСОБНОГО ПОТОМСТВА КРЫС, ВЫЗВАННЫХ ЦИТОСТАТИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ НА СТАДИИ ПРОГЕНЕЗА

Т.Г. Боровская¹, М.Е. Полуэктова¹, А.В. Вычужанина¹, Ю.А. Щемерова¹, В.Е. Гольдберг²

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

Россия, 634009, г. Томск, пр. Ленина, 3. E-mail: repropharm@yandex.ru¹

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Россия, г. Томск, 634009, пер. Кооперативный, 5. E-mail: goldbergve@mail.ru²

Аннотация

Введение. В связи с обнадеживающими результатами лечения ряда злокачественных новообразований возрастает количество женщин репродуктивного возраста, готовых реализовать свою детородную функцию. Потомство данной категории пациентов вследствие генотоксичности цитостатического лечения, относится к группе риска. **Целью исследования** является экспериментальное изучение возможности снижения отдаленных отрицательных последствий действия на потомство цитостатического препарата этопозид с помощью лекарственного средства Глутоксим, обладающего антиоксидантными свойствами. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на белых аутбредных крысах-самках Вистар (n=45), возраст – 2,5 мес; 15 из которых составили группу интактных животных (фон); 15 – контрольную (крысам вводили цитостатический препарат) и 15 – группу крыс, получавших Глутоксим® (Глутамил-Цистеинил-Глицин динатрия, Фарма Вам, Россия) в дозе 50 мг/кг за 5 дней до и 5 дней после цитостатического воздействия. **Результаты.** Установлено, что в потомстве крыс-самок, получавших этопозид за 3 мес до скрещивания, отмечалось возрастание количества плодов с наружными кровоизлияниями и патологическими изменениями внутренних органов. У родившегося потомства наблюдалось снижение скорости формирования сенсорно-двигательных рефлексов, способности к обучению, адаптивному поведению. В потомстве крыс-самок, получавших сочетанное введение этопозид и Глутоксима, все исследуемые показатели не отличались от фоновых значений. **Выводы.** Глутоксим является эффективным лекарственным средством для коррекции патологических изменений в потомстве, полученном от крыс-самок, перенесших цитостатическое воздействие.

Ключевые слова: отдаленные последствия, цитостатическая химиотерапия, потомство, крысы-самки, Глутоксим, генотоксичность, генетический риск, яйцеклетка.

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF PATHOLOGICAL CHANGES IN THE VIABLE OFFSPRING OF RATS, CAUSED BY CYTOSTATIC IMPACT AT THE STAGE OF PROGENESIS

T.G. Borovskaya¹, M.E. Poluektova¹, A.V. Vychuzhanina¹, Yu.A. Shchemerova¹
V.E. Goldberg²

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

3, Lenin Avenue, 634009-Tomsk, Russia. E-mail: repropharm@yandex.ru¹

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia²

5, Kooperativny str., 634009-Tomsk, Russia. E-mail: goldbergve@mail.ru²

Abstract

Background. The number of reproductive-aged women with cancer, who desire child bearing, has increased with improvements in cancer detection and treatment. Cancer treatments have the potential to cause germline mutations that might increase the risk of cancer in the progeny of cancer patients. **The aim of the study** was to assess the feasibility of reducing the long-term side effects of Etoposide on the progeny of rats using Glutaxim. **Material and Methods.** Forty-five white outbred female Wistar rats, 2.5-month-old, were divided into 3 groups. Group I consisted of 15 intact rats. Group II comprised 15 rats treated with cytostatic drug (the control group). Group III consisted of 15 rats treated with Glutaxim® (Glutayil-Cysteiny-Glycine, Pharma Vam Ltd., Russia) at a dose of 50 µg/kg 5 days before and 5 days after receiving cytostatic drug. **Results.** An increase in the number of fetuses with external hemorrhages and pathological changes in internal organs was found in the progeny of female rats receiving Etoposide 3 months before mating. The progeny experienced a decrease in the rate of formation of sensory-motor reflexes, ability to learn and adaptive behavior. All studied parameters did not differ from background values in the progeny of female rats treated with combination of Etoposide and Glutaxim. **Conclusion.** Glutaxim is the effective drug for correction of pathological changes in the progeny of female rats receiving cytostatic drugs.

Key words: long-term effects, cytostatic chemotherapy, progeny, female rats, glutaxim, genotoxicity, genetic risk, egg cell.

Введение

Начало XXI века характеризуется революционными событиями в различных областях онкологии [1]. В настоящее время, по данным Американского общества клинической онкологии (ASCO), 68 % взрослых и 81 % детей с диагнозом рак имеют длительные полные ремиссии. Таких пациентов насчитывается около 25 млн человек. Это большое достижение по сравнению с последними десятилетиями прошлого столетия, когда 5-летняя выживаемость наблюдалась у 50 % взрослых и 62 % детей. Сегодня одним из главных критериев успешного лечения является качество жизни пациентов [2, 3]. Важной составляющей качества жизни является реализация детородной функции [4, 5]. По данным исследователей из США, 1 из 60 женщин, перенесших терапию цитостатиками, была в возрасте до 39 лет, и почти половина из них хотели бы в будущем иметь детей [6].

Химиотерапия используется у значительного числа онкологических пациентов, и нарушение репродуктивной функции является закономерным следствием ее применения. Несмотря на надежды, связанные с заморозкой тканей половых желез, эта технология далеко

не всегда оправдывается [7]. В связи с этим важным является вопрос о сохранении овариального резерва после цитостатической терапии. В клинической практике существует такая возможность, для этого используются гонадотропин – релизинг-гормоны, уменьшающие количество клеток мишеней (делящихся клеток) путем остановки функции яичников [8]. Однако это только одна сторона решения проблемы, которая стоит в тесной связи с другой – необходимостью снижения риска генетических нарушений, вызываемых цитостатиками в созревающих ооцитах. Женщин, имеющих в анамнезе онкологическую патологию и решившихся на беременность, волнует вопрос о здоровье будущего ребенка [4], неслучайно долгосрочные побочные эффекты химиопрепаратов на потомство становятся предметом пристального внимания репродуктологов [9, 10].

Химиотерапия может вызвать трансгенерационные отдаленные эффекты [5]. Возможность формирования у плода врожденной патологии связана с тем, что не все поврежденные яйцеклетки после цитостатических воздействий элиминируются. Не подвергаются элиминации генетические и эпигенетические изменения, вызываемые цитостатиками.

В связи с этим не вызывает сомнений тот факт, что такое потомство будет относиться к группе риска [4, 5, 9, 11]. В потомстве животных, получавших противоопухолевые препараты за 3 мес до скрещивания, наблюдается повышенное количество плодов с наружными кровоизлияниями и с патологическими изменениями внутренних органов [11]. Побочные эффекты у потомства могут проявляться в виде отклонений в функционировании мозга, так как цитостатические препараты вызывают изменение в системе репарации белков, участвующих в продуцировании миелина [5].

Установлено, что универсальным механизмом действия цитостатической терапии является индукция окислительного стресса [12]. Повышенное образование свободных радикалов вносит существенный вклад в большинство побочных эффектов цитостатиков, а также в их генотоксическое действие на созревающие половые клетки. В связи с этим оправданным является использование антиоксидантов в качестве модификаторов биологических реакций цитостатических препаратов [13]. К числу корректорных свойств ряда антиоксидантов относится способность снижать уровень цитогенетических нарушений в соматических и половых клетках [14]. В литературе имеются данные о снижении токсического действия на потомство с помощью урометиксана, антиоксиданта из группы тиолсодержащих соединений. Однако степень выраженности корректорных свойств урометиксана оказалась невысокой [15].

Лекарственное средство Глутоксим® является структурным аналогом глутатиона – основного звена антиоксидантной системы клетки. Препарат имеет антирадикальные свойства и обладает способностью регулировать процессы липопероксидации [16]. При этом спектр фармакологического действия Глутоксима является более широким. Он характеризуется цитопротекторными свойствами – способствует реализации действия регуляторных молекул пептидной природы на нормальные и трансформированные клетки, обладает способностью стимулировать костномозговое кроветворение, восстанавливать подавленные иммунные реакции. Глутоксим показан для снижения гепато- и гематологической токсичности в онкологической практике [17, 18]. Важным свойством препарата является способность подавлять индуцированный мутагенез и механизмы передачи мутационных изменений дочерним клеткам [16].

Целью исследования явилось экспериментальное изучение влияния препарата Глутоксим® на состояние потомства крыс-самок, перенесших цитостатическое воздействие на стадии прогенеза (созревания половых клеток).

Материал и методы

Эксперименты проведены на белых аутбредных крысах-самках Вистар (n=45), возраст – 2,5 мес.

Из них 15 крыс составили группу интактных животных (фон); 15 – контрольную (крысам вводили цитостатический препарат) и 15 – группу крыс, получавших Глутоксим® (Глутамил-Цистеинил-Глицин динатрия, Фарма Вам, Россия) в дозе 50 мкг/кг за 5 дней до и 5 дней после цитостатического воздействия. Крыс содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Животных размещали в клетках (VELAZ) со стерилизованной мелкой стружкой в качестве подстила в соответствии с нормами размещения. Температура воздуха в виварии 20–24 °С, относительная влажность – $50 \pm 20\%$, вентиляция воздуха через HEPA фильтр, воздухообмен – 12–15 объемов помещения/час, световой режим – 12:12 ч, уровень шума и освещенности – 50–55 дБ и 300–350 Лк соответственно; определяемый датчиком диапазон значений концентрации летучих веществ (аммиак, оксид углерода) составлял 0,4–1 мг/м³. Температура и влажность постоянно контролировались в каждой экспериментальной комнате.

В качестве модели цитостатического воздействия использовался препарат этопозид (Vepeside, Bristol-Myers Squibb), который вводили однократно, внутривенно в максимально переносимой дозе (МПД), равной 30 мг/кг. Выбор этопозид обусловлен тем, что он является мощным индуктором окислительного стресса и обладает выраженной мутагенной активностью [19, 20]. С другой стороны, в экспериментальных исследованиях установлено, что потомство крыс-самок, получавших этопозид за 3 мес до скрещивания, характеризуется повышением количества плодов с патологическими изменениями внутренних органов и рядом нарушений со стороны центральной нервной системы [11].

Крыс-самок всех групп ссаживали с интактными самцами в отдаленные сроки после введения этопозид (через 3 мес), что соответствует проявлению последствий воздействия на яйцеклетки созревающих (примордиальных) фолликулов. Спаривание регистрировали с помощью вагинальных мазков. Половину самок умерщвляли методом смещения шейных позвонков на 20-й день беременности. После вскрытия проводили макроскопический осмотр живых плодов с оценкой количества наружных кровоизлияний. Кроме того, определяли массу и кранио-каудальный размер плодов. Далее плоды помещали в раствор Боуэна для фиксации и последующего исследования внутренних органов по методу Вильсона. Оставшуюся часть беременных самок оставляли до родов. У родившегося потомства на 5, 30 и 60-й дни жизни оценивали функциональное состояние центральной нервной системы по тестам «избегание обрыва», «открытое поле», «условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ), тест избегания стресс-ситуации

(Хандерсона в модификации Н.А. Бондаренко) [21]. Обработку полученных данных проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни и углового преобразования Фишера. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$ [22].

Результаты и обсуждение

При внешнем осмотре плодов в сравниваемых группах грубые аномалии развития не выявлялись. Плоды не отличались друг от друга ни по массе, ни по кранио-каудальному размеру. Во всех группах наблюдалось появление плодов с наружными кровоизлияниями и патологическими изменениями внутренних органов (кровоизлияния, холестаза, нефроптоз, гидроцефалия гемоперикард, тимомегалия и др.), но степень выраженности этих эффектов существенно варьировала. В потомстве крыс-самок, получавших этопозид (контроль) отмечалось возрастание в 2,5 раза по сравнению с фоном (интактные животные) количества плодов с наружными кровоизлияниями (рис. 1), в 3 раза – количества плодов с различными патологическими изменениями внутренних органов. В тесте «избегание обрыва» (на 5-й день жизни) количество животных, обладающих этим рефлексом, составило 78 % (рис. 2), фоновые значения – 90 % ($p \leq 0,05$). Изучение поведения животных в одномесячном возрасте в тесте «открытое поле» показало, что в контроле наблюдалось уменьшение (в 2,6 раза)

числа пересеченных ими квадратов и совершённых вертикальных стоек (рис. 3), что свидетельствует о нарушении ориентировочных рефлексов и угнетенном состоянии ретикулярной формации. При оценке поведения крыс контрольной группы в двухмесячном возрасте в тесте УРПИ оказалось, что время пребывания в светлой камере во второй день опыта сокращалось почти на 40 % по сравнению с фоном (таблица), что говорит о сниженной способности у потомства контрольной группы к обучению. В тесте Хандерсона (в модификации Н.А. Бондаренко) потомство во всех исследуемых группах обладало способностью избегать стресс-ситуацию. Время плавания во внутреннем и внешнем цилиндре у животных всех групп оказалось сходным, но выполнение этого рефлекса на его терминальных стадиях (время поднятия на сетку) в контроле оказалось более продолжительным и составило $22,38 \pm 3,77$, у интактных животных – $3,90 \pm 0,41$ ($p \leq 0,05$).

Оценка состояния потомства самок, получавших Глутоксим, показала, что количество плодов с наружными кровоизлияниями и патологическими изменениями внутренних органов значимо ниже по сравнению с контролем и соответствовало фоновым значениям (рис. 1). Спектр патологических изменений оказался прежним. Количество крысят со сформировавшимся рефлексом «избегания обрыва» на 5-й день жизни значимо выше по срав-

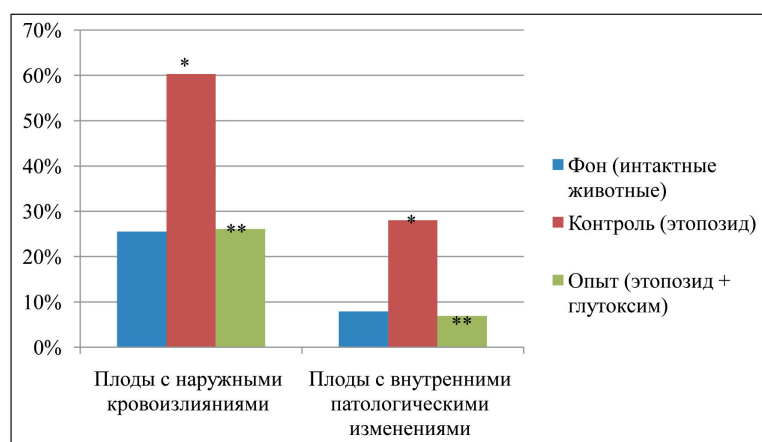


Рис. 1. Количество плодов с наружными кровоизлияниями и патологическими изменениями внутренних органов в потомстве крыс-самок, которые перенесли воздействие этопозидов и глутоксима.

Примечания: * – различия статистически значимы по сравнению с фоном ($p_0 \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p_0 \leq 0,05$)

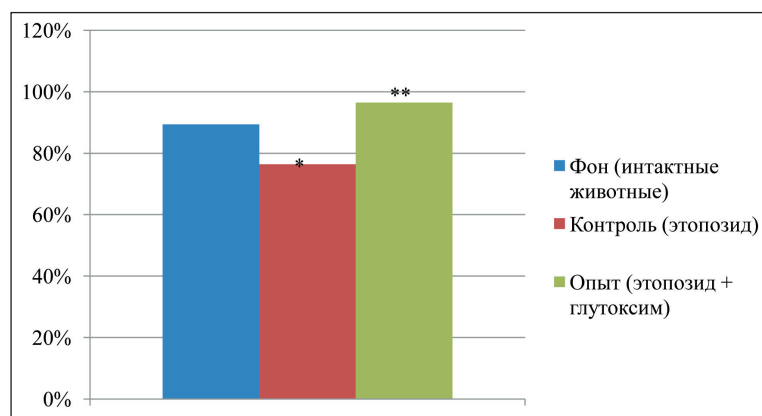


Рис. 2. Количество крысят (на 5-й день жизни), способных к «избеганию края», из потомства крыс-самок, которые перенесли воздействие этопозидов и глутоксима.

Примечания: * – различия статистически значимы по сравнению с фоном ($p_0 \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p_0 \leq 0,05$)

Таблица

Способность к обучению (тест УРПИ) крысят в двухмесячном возрасте в потомстве крыс-самок, которые перенесли воздействие этопозид и глутоксима

Группы животных	Количество крысят со сформировавшимся норковым рефлексом	Время пребывания крысят-самцов в светлой камере во 2-й день, сек
Фон (интактные)	100 %	180 ± 0,0
Контроль (этопозид)	100 %	108,8 ± 20,43*
Опыт (этопозид + глутоксим)	100 %	172,40 ± 7,6**

Примечания: * – различия статистически значимы по сравнению с фоном ($p_{\text{U}} \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p_{\text{U}} \leq 0,05$).

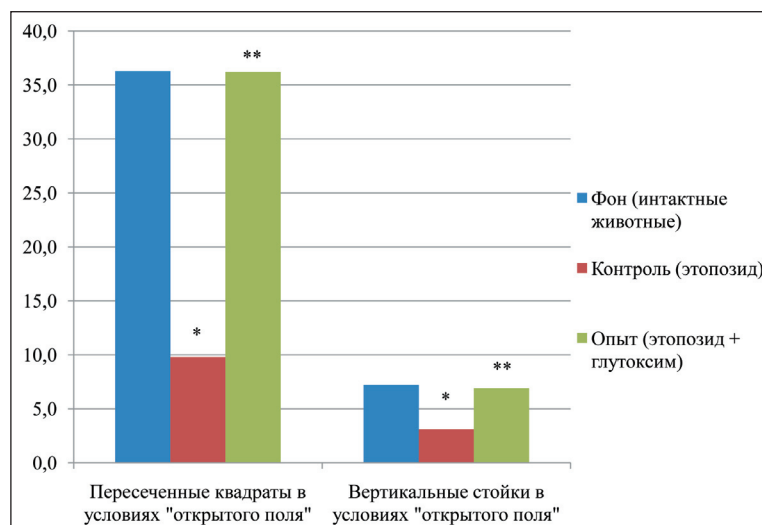


Рис. 3. Состояние двигательной активности крысят (на 30-й день жизни, тест «открытое поле») в потомстве крыс-самок, которые перенесли воздействие этопозид и глутоксима.

Примечания: * – различия статистически значимы по сравнению с фоном ($p_{\text{U}} \leq 0,05$); ** – различия статистически значимы по сравнению с контролем ($p_{\text{U}} \leq 0,05$).

нению с контролем и не отличалось от такового в группе интактных животных (рис. 2). Судя по тесту «открытое поле», потомство крыс, получавших этопозид в сочетании с Глутоксимом, характеризовалось повышенной по сравнению с контролем вертикальной и горизонтальной двигательной активностью. Так, количество пересеченных квадратов и вертикальных стоек в экспериментальной группе не отличалось от фоновых значений (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют о нормализации на фоне использования Глутоксима ориентировочно-исследовательского поведения у потомства. В тесте УРПИ было установлено, что способность к обучению у животных экспериментальной группы сохранялась на уровне таковой у интактных животных. Так, время их пребывания в светлой камере во второй день опыта достоверно возрастало по сравнению с контролем и не отличалось от фоновых значений (таблица). Потомство экспериментальной группы животных по времени поднятия на сетку (тест Хандерсона в модификации Н.И. Бондаренко) не отличалось от фона ($3,09 \pm 0,41$) и составило $5,22 \pm 1,08$ ($p \geq 0,05$).

Этот показатель оказался значимо сниженным по сравнению с контролем.

Полученные данные свидетельствуют о том, что отдаленные последствия воздействия этопозид на потомство крыс-самок, получавших препарат за 3 мес до скрещивания в сочетании с Глутоксимом, практически не выявлялись. Это может быть следствием защитного действия модификатора на яйцеклетку примордиальных фолликулов. Нельзя исключить, что в корректорные свойства Глутоксима могло внести свой вклад его возможное благоприятное влияние на организм матери. Это предположение основано на том, что, с одной стороны, известна способность Глутоксима стимулировать эритроидный росток кроветворения после химиотерапии [17]. С другой стороны, известен факт, что у беременных животных в отдаленные сроки после введения этопозид развивается регенераторная анемия [23].

Таким образом, Глутоксим является эффективным лекарственным средством для коррекции патологических изменений в потомстве крыс-самок, перенесших цитостатическое воздействие.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Гарин А.М. Эволюция и революционные события в онкологической науке в конце XX и первом десятилетии XXI века. Вестник РАМН. 2012; 3: 32–36. [Garin A.M. Evolution and revolutionary events in oncology in the end of XX, beginning of XXI century. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2012; 3: 32–36. (in Russian)].

2. Wisotzky E., Khanna A., Maltser N.H. Scope of practice in cancer rehabilitation. Current physical medicine and rehabilitation reports. 2017; 5 (1): 55–63.

3. Чойзонов Е.Л., Балацкая Л.Н., Дубский С.В., Чижевская С.Ю., Куприянова И.Е., Красавина Е.А., Тузиков С.А., Полищук Т.В., Попов Д.Н., Жогина Ж.А., Мусабаева Л.И., Слонимская Е.М., Бехер О.А., Коломиец Л.А., Чуруксаева О.Н., Молчанов С.В., Жуйкова Л.Д. Качество

жизни онкологических больных. Томск: Печатная мануфактура, 2011. 152. [Choyznzonov E.L., Balatskaya L.N., Dubsky S.V., Chizhevskaya S.Yu., Kupriyanova I.E., Krasavina E.A., Tuzikov S.A., Polishchuk T.V., V. Popov D.N., Zhogina Zh.A., Musabaeva L.I., Slonimskaya E.M., Bekher O.A., Kolomiets L.A., Churuktsaeva O.N., Molchanov S.V., Zhuykova L.D. Quality of life of oncologic patients. Tomsk, 2011. 152. (in Russian)].

4. Даниленко А.А., Шахтарина С.В., Щелконогова Л.Н., Павлов В.В. Здоровье детей, родившихся у женщин после лучевого, химио- и химиолучевого лечения лимфомы Ходжкина. Онкогематология. 2014; 9 (2): 6–12. [Danilenko A.A., Shakhhtarina S.V., Shchelkonogova L.N., Pavlov V.V. Health of children born to women after radiation and chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. Oncohematology. 2014; 9 (2): 6–12. (in Russian)]. doi: 10.17650/1818-8346-2014-9-2-6-12.

5. Kovalchuk A., Ilynskyy Y., Woycicki R., Rodriguez-Juarez R., Metz G.A.S., Kovalchuk O. Adverse effects of paternal chemotherapy exposure on the progeny brain: intergenerational chemobrain. Oncotarget. 2018 Jan 23; 9 (11): 10069–10082. doi: 10.18632/oncotarget.24311.

6. Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2010 Sep-Oct; 60 (5): 277–300. doi: 10.3322/caac.20073.

7. Боярский К.Ю., Гайдук С.Н. Онкофертильность: возможность сохранения репродуктивной функции у онкологических больных. Вопросы онкологии. 2013; 59 (5): 555–564. [Bojarsky K.Yu., Gaidukov S.N. Oncofertility: the ability to preserve reproductive function in cancer patients. Problems in Oncology. 2013; 59 (5): 555–564. (in Russian)].

8. Senra J.C., Roque M., Talim M.C.T., Reis F.M., Tavares R.L.C. Gonadotropin-releasing hormone agonists for ovarian protection during cancer chemotherapy systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2018 Jan; 51 (1): 77–86. doi: 10.1002/uog.18934.

9. Kujjo L.L., Chang E.A., Pereira R.J.G., Dhar S., Marrero-Rosado B., Sengupta S., Wang H., Cibelli J.B., Perez G.I. Chemotherapy-Induced Late Transgenerational Effects in Mice. PLoS One. 2011 Mar 17; 6 (3): e17877. doi: 10.1371/journal.pone.0017877.

10. Коришун М.Н., Коришун Е.С., Даренков С.П. Влияние лучевой и химиотерапии на сперматогенез. Прогноз мужской фертильности после лечения онкологических заболеваний. Исследования и практика в медицине. 2017; 4 (S2): 60–61. [Korshunov M.N., Korshunova E.S., Darenkov S.P. The influence of radiation and chemotherapy on spermatogenesis. Prognosis of male fertility after the treatment of oncological disease. Research'n Practical Medicine Journal. 2017; 4 (S2): 60–61. (in Russian)].

11. Боровская Т.Г., Перова А.В., Пахомова А.В., Полуэктова М.Е., Гольдберг В.Е. Состояние потомства крыс-самок после введения цитостатических препаратов разных групп. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008; 10 (146): 409–254. [Borovskaya T.G., Perova A.V., Pachomova A.V., Poluektova M.E., Gol'dberg V.E. The stage of offspring of female rats after treatment with cytostatics of various groups. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2008; 146 (4): 429–432. (in Russian)].

12. Zhang J., Lei W., Chen X., Wang S., Qian W. Oxidative stress response induced by chemotherapy in leukemia treatment. Mol Clin Oncol. 2018 Mar; 8 (3): 391–399. doi: 10.3892/mco.2018.1549.

13. Иванова А.А., Иванов В.В., Чердынцева Н.В., Шетилова В.А., Казия Т.В. Способность модифицированных витаминов Е и С модулировать терапевтическое действие циклофосфана. Сибирский онкологический журнал 2009; 2: 31–33. [Ivanova A.A., Ivanov V.V., Cherdynitseva N.V., Shetilova V.A., Kagiya T.V. Ability of modified vitamins

E and C modulate therapeutic effect of cyclophosphane. Siberian Journal of Oncology. 2009; 2: 31–33. (in Russian)].

14. Kaur A., Kaur D., Arora S. Evaluation of antioxidant and anti-mutagenic potential of Justicia adhatoda leaves extract. Afr J Biotechnol. 2015; 14 (21): 1807–1819. doi: 10.5897/AJB2015.14486.

15. Боровская Т.Г., Гольдберг В.Е. Овариотоксичность цитостатических препаратов и способы ее фармакологической коррекции. Томск: Изд-во Томского университета, 2007. 116. [Borovskaya T.G., Goldberg V.E. Ovariotoxicity of cytostatic drugs and methods for its pharmacological correction. Tomsk: Tomsk University Press, 2007. 116. (in Russian)].

16. Феценко Ю.И., Ииуж С.Г., Матвиенко Ю.А. Терапевтические возможности инновационного иммуномодулятора в пульмонологии и фтизиатрии. Украинский пульмонологический журнал. 2012; 3: 50–54. [Feshchenko Yu.I., Ischuk S.G., Matvienko Yu.A. Therapeutic possibilities of an innovative immunomodulator in pulmonology and phthisiology. Ukrainian Pulmonology Journal. 2012; 3: 50–54. (in Russian)].

17. Gumireddy K., Li A., Cao L., Yan J., Liu L., Xu X., Pazoles C., Huang Q. NOV-002, A Glutathione Disulfide Mimetic, Suppresses Tumor Cell Invasion and Metastasis. J Carcinog Mutagen. 2013 Apr 30; 2013. pii: S7–002. doi: 10.4172/2157-2518.S7-002.

18. Богущ Т.А., Дудко Е.А., Богущ Е.А., Кирсанов В.Ю., Антонов В.Г. Глутоксим как ингибитор фенотипа множественной лекарственной резистентности, ассоциированной с экспрессией Pgp. Антибиотики и химиотерапия. 2010; 5–6: 18–23. [Bogush T.A., Dudko E.A., Bogush E.A., Kirsanov V.Yu., Antonov V.G. Glutoxime, as an Inhibitor of Multiple Drug Resistance Phenotype Associated with Pgp Expression. Antibiotics and Chemotherapy. 2010; 5–6: 18–23. (in Russian)].

19. Ganga U.K., Kishori U., Reddy P.S. Cisplatin and/or etoposide induces oxidative stress in testicular, hepatic and kidney tissues in male albino mice. J Biol Earth Sci. 2013; 2 (2): 249–254.

20. Papież M.A. The influence of curcumin and (-)-epicatechin on the genotoxicity and myelosuppression induced by etoposide in bone marrow cells of male rats. Drug Chem Toxicol. 2013 Jan; 36 (1): 93–101. doi: 10.3109/01480545.2012.726626.

21. Дурнев А.Д., Смольникова Н.М., Скосырева А.М., Шреде О.В., Гуськова Т.А., Верстакова О.Л., Сябаев Р.Д. Методические рекомендации по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М., 2013. 87–87. [Durnev A.D., Smol'nikova N.M., Skosyeva A.M., Shrede O.V., Gus'kova T.A., Verstakova O.L., Syubayev R.D. Guidelines for the study of reproductive toxicity of drugs. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Moscow, 2013. 87–90. (in Russian)].

22. Петри А., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика. М., 2015. 216. [Petri A., Sebin K. Medical Statistics. Moscow, 2015. 216. (in Russian)].

23. Тимина Е.А., Карпова Г.В., Чуринов А.А., Боровская Т.Г., Ламзина Т.Ю., Гольдберг В.Е. Реакция системы крови в отдаленные сроки после воздействия этопозида у беременных крыс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007; Прил. 1: 75–79. [Timina Ye.A., Karpova G.V., Churin A.A., Borovskaya T.G., Lamzina T.YU., Gol'dberg V.Ye. The reaction of the blood system in the long term after exposure to etoposide in pregnant rats. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2007; Suppl. 1: 75–79. (in Russian)].

Поступила/Received 10.04.18

Принята в печать/Accepted 19.06.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Боровская Татьяна Геннадьевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией фармакологии репродуктивной системы, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: reprop-harm@yandex.ru. SPIN-код: 6929-5635. Researcher ID (WOS): I-9421-2017.

Полуэктова Марина Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: reprop-harm@yandex.ru. SPIN-код: 2155-4158. Researcher ID (WOS): J-1748-2017.

Вычужанина Анна Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: reprop-harm@yandex.ru. SPIN-код: 3040-3895. Researcher ID (WOS): J-1763-2017.

Щемерова Юлия Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии репродуктивной системы, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: reprop-harm@yandex.ru. Researcher ID (WOS): D-1212-2018.

Гольдберг Виктор Евгеньевич, доктор медицинских наук, заведующий отделением химиотерапии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: goldbergve@mail.ru. SPIN-код: 7587-0560.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Tatyana G. Borovskaya, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Pharmacology of the Reproductive System, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: repropharm@yandex.ru. Researcher ID (WOS): I-9421-2017.

Marina E. Poluektova, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Pharmacology of the Reproductive System, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: repropharm@yandex.ru. Researcher ID (WOS): J-1748-2017.

Anna V. Vychuzhanina, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Pharmacology of the Reproductive system, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: repropharm@yandex.ru. Researcher ID (WOS): J-1763-2017.

Yuliya A. Shchemerova, PhD, Researcher, Laboratory of Pharmacology of the Reproductive System, Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: repropharm@yandex.ru. Researcher ID (WOS): 1212-2018.

Viktor E. Goldberg, MD, DSc, Professor, Head of Chemotherapy Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: goldbergve@mail.ru.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-86-94
УДК: 616-006.81-033.2-091.811:577.21

Для цитирования: Михайлова И.Н., Анурова О.А., Лушникова А.А., Цыганова И.В., Сендерович А.И., Кондратьева Т.Т., Демидов Л.В., Мазуренко Н.Н. Фенотипическая пластичность метастатической меланомы. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 86–94. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-86-94.
For citation: Mikhaylova I.N., Anurova O.A., Lushnikova A.A., Tsyganova I.V., Senderovich A.S., Kondratieva T.T., Demidov L.V., Mazurenko N.N. Phenotypic plasticity of metastatic melanoma. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 86–94. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-86-94.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ

И.Н. Михайлова, О.А. Анурова, А.А. Лушникова, И.В. Цыганова,
А.И. Сендерович, Т.Т. Кондратьева, Л.В. Демидов, Н.Н. Мазуренко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, г. Москва, Россия
Россия, г. Москва, 115478, Каширское шоссе, 24. E-mail: irmikhaylova@gmail.com

Аннотация

Актуальность. Метастатическая меланوما отличается клинико-морфологической гетерогенностью и пластичностью. Встречаются редкие случаи метастатической меланомы, которые практически не экспрессируют меланоцитарных маркеров. Гистологически такие меланомы требуют дифференциальной диагностики от морфологически сходных немеланоцитарных опухолей, саркомы или лимфомы. **Цель исследования** – исследование неординарных случаев метастатической меланомы с низкой экспрессией дифференцировочных маркеров. **Материал и методы.** Описаны 15 случаев меланомы с необычными клинико-морфологическими характеристиками. Опухоли подверглись морфологическому, цитологическому исследованию, иммуногистохимическому и FISH-анализу, были определены мутации в генах *BRAF*, *NRAS* и *KIT*. **Результаты.** Первичные меланомы часто не содержали пигмента, что затрудняло дифференциальную диагностику опухолей. Опухоли располагались чаще всего на спине, голени или голове, у 4 пациентов первичные очаги не выявлены. Метастатические поражения представляли собой крупные узловые новообразования в мягких тканях в области спины либо нижней конечности. Большинство опухолей относились к смешанному или веретенноклеточному гистологическим типам. Веретенообразные клетки отмечены и при цитологических исследованиях. При генетическом анализе мутации в гене *BRAF* выявлены в 27 % меланом, мутации в генах *NRAS* и *KIT* не обнаружены. В 4 случаях с помощью FISH проведен анализ на наличие реаранжировки гена *EWSR1*, при этом диагноз саркомы не подтвердился. Полученные результаты указывают на гистологическую и молекулярную неоднородность и фенотипическую пластичность исследованных меланом. Ряд выявленных молекулярно-генетических особенностей сближает эти опухоли с саркомами.

Ключевые слова: меланوما кожи, цитологические и гистологические особенности, мутационный статус опухоли, гетерогенность, генетическое исследование, иммуногистохимические маркеры.

PHENOTYPIC PLASTICITY OF METASTATIC MELANOMA

I.N. Mikhaylova, O.A. Anurova, A.A. Lushnikova, I.V. Tsyganova,
A.S. Senderovich, T.T. Kondratieva, L.V. Demidov, N.N. Mazurenko

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,
Moscow, Russia
24, Kashirskoye shosse, 115478, Moscow, Russia. E-mail: irmikhaylova@gmail.com

Abstract

Introduction. Metastatic melanoma is characterized by clinical and morphological heterogeneity and plasticity. Rare cases of metastatic melanoma are known, that have no visual expression of melanocytic markers. Contradictory histology of such melanomas requires a differential diagnosis from morphologically similar non-melanocytic tumors, sarcoma or lymphoma. **Objective is** to describe the extraordinary cases of metastatic melanomas with low expression of differentiation markers. **Material and Methods.** 15 melanoma cases with unusual clinical and morphological characteristics were included in the study. These tumors were examined by pathologist and cytologist, by immunohistochemical and FISH analyses, mutations in *BRAF*, *NRAS* and *KIT* genes were detected by PCR. **Results.** Some primary tumors were amelanotic, therefore, they were difficult for differential tumor diagnosis. Most frequently, primary tumors were located on the back, shin or head. In 4 patients the primary focuses were not detected. Metastatic lesions were as large nodular tumors in soft tissues of the back or lower limb. Most tumors belong to mixed or spindle-cell histological types. Spindle-shaped cells were also revealed by cytological analysis. *BRAF* gene mutations were identified by genetic analysis in 27 % of tumors, *NRAS* and *KIT* gene mutations were not detected. In 4 cases FISH analysis was performed to detect *EWSR1* gene rearrangements, but it did not confirm the diagnosis of sarcoma. **Conclusion.** The results indicate the presence of a heterogeneous group of melanoma cases, which have a number of morphological and molecular features that bring them closer to sarcomas.

Key words: skin melanoma, cytological and histological features, tumor mutation status, heterogeneity, genetic research, immunohistochemical markers.

Введение

Меланома – одно из наиболее опасных злокачественных новообразований кожи с высоким риском метастазирования и рецидивов. Метастатическая меланома прогностически крайне неблагоприятна и резистентна к традиционной химиотерапии, однако улучшение результатов лечения стало возможным благодаря совершенствованию таргетной и иммунотерапии [1, 2].

Меланома отличается клинико-морфологической гетерогенностью и пластичностью [3, 4]. Диагноз, поставленный при дермоскопии, подтверждают с помощью гистологических и ИГХ (иммуногистохимических) исследований. Для меланомы кожи характерно позитивное окрашивание S100, Melan-A или HMB-4 (маркер MITF менее специфичен) и негативное окрашивание на цитокератины, p63 и гладкомышечный актин [5]. Клинико-морфологическая гетерогенность меланомы проявляется в различной локализации опухолей, в фазе опухолевой прогрессии и сопряжена с определенными молекулярно-генетическими нарушениями. Наиболее часто в меланоме кожи выявляют мутации генов *BRAF* (50 %) или *NRAS* (20 %), реже обнаруживают мутации генов *NF1*, *RAC1*, *KIT* и др. [1, 2].

В России частота выявления меланомы на поздних стадиях заболевания остается высокой. Метастазы меланомы обнаруживают в коже, в регионарных лимфоузлах, легких, печени, головном мозге и костях. В ряде случаев клиническая картина заболевания обусловлена метастазами без выявленного первичного очага (БВПО). Иногда локализацию первичной меланомы невозможно установить из-за регрессии опухоли, вплоть до ее полного исчезновения.

В отличие от слабо пигментированных метастазов, первичная беспигментная или малопиг-

ментная меланома является редким вариантом, для диагностики которого используют иммуногистохимические маркеры. В большинстве случаев метастатической меланомы выявляют фокальную ядерную или цитоплазматическую экспрессию S100. Однако экспрессия вторичных меланоцитарных маркеров, таких как Melan-A/MART-1, HMB45, тирозиназа и MITF, высоко вариабельна. Метастатические опухоли, особенно веретенноклеточная меланома, не экспрессируют данные маркеры [3–7]. В связи с этим говорят о низкодифференцированной и дедифференцированной злокачественной меланоме как первичной, так и метастатической [7].

Различают несколько типов дивергентной дифференцировки злокачественной меланомы [4, 7]. Фибробластная/миофибробластная дифференцировка наблюдается исключительно в веретенноклеточной десмопластической злокачественной меланоме с саркоматоидной дедифференцировкой [3–4, 7–9]. Шванновская дифференцировка встречается в доброкачественных внутридермальных невусах и в злокачественной меланоме, впервые описанной как нейросаркоматоидная трансформация [10]. Также описана меланома с эпителиальной (аденокарциноматозной) [11], рабдомиобластной [7] и нейроэндокринной дифференцировкой [4].

Патогистологические особенности таких опухолей, как правило, недостаточно убедительны для дифференциальной диагностики меланомы, поскольку экспрессия дифференцировочных маркеров в них низкая или отсутствует. Такие меланомы могут представлять неожиданные или необычные фенотипы, гистологически сходные с различными опухолями. Это создает диагностические трудности и требует углубленной дифференциальной диагностики от морфологически похожих немеланоцитарных опухолей, например саркомы или карциномы [4, 7, 12].

Среди неэпителиальных опухолей особо выделяется так называемая меланома мягких тканей, или светлоклеточная саркома [6, 12–14]. Подобно меланоме, в ней экспрессируются S100, SOX10 и вторичные меланоцитарные маркеры. Однако светлоклеточная саркома характеризуется более интенсивным диффузным окрашиванием HMB-45 по сравнению с S100, что не характерно для меланомы. Поскольку гистологические и иммуногистохимические характеристики меланомы и светлоклеточной саркомы перекрываются, для уточнения диагноза и исключения меланомы необходим FISH-анализ на наличие реаранжировки гена *EWSR1*. В светлоклеточной саркоме обнаруживают транслокации с образованием слитного гена и химерного белка *EWSR1-ATF1* (12;22, q13;q12) или с образованием *EWSR1-CREB1* (2;22, q34;q12). Эти химерные онкобелки индуцируют экспрессию транскрипционного фактора *MtTF*, что ведет к пролиферации и дифференцировке опухолевых клеток [12–14].

Целью исследования явилась характеристика редких образцов меланомы, которые привлекли наше внимание необычной клинической картиной и морфологическими особенностями.

Материал и методы

Исследовали 15 случаев меланомы с необычной клинико-морфологической картиной из выборки более 250 пациентов с первичной или метастатической меланомой, обратившихся в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ в 2013–15 гг.

Цитологические исследования. Три опухолевых образца исследовали с помощью светоптической микроскопии. Высушенные мазки фиксировали с использованием красителя Лейшмана и контрастировали азур-эозином.

ИГХ исследования. Шесть опухолевых образцов, полученных от пациентов с первоначальным диагнозом саркома/лимфома, исследовали иммуногистохимически с использованием антител к Ki-67 (фирма CellMarque); S100 (фирма CellMarque); MelanA (фирма BioGenex); HMB 45 (фирма Dako); *MtTF* (фирма CellMarque); тирозиназе (фирма CellMarque); Н-кальдесмину (фирма Dako); CD99 (фирма CellMarque); виментину (фирма BioGenex); PanCKAE1/AE3 (фирма CellMarque); CK5/6 (фирма CellMarque); P63 (фирма Eptomics); EMA (фирма CellMarque); хромогранину А (фирма BioGenex); синаптофизину (фирма BioGenex); MuM1 (фирма CellMarque).

FISH-анализ проведен для 4 опухолей с подозрением на саркому. FISH-реакция проводилась по стандартному протоколу, предложенному фирмой-производителем флуоресцентного зонда, Kreatech (Нидерланды) с использованием зонда ONEWSR1 (22q12) Break. Оценка результатов производилась с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscop 2Plus (Zeiss).

Генетическое исследование опухолей проведено на 15 образцах ДНК, полученных из опухолевых клеток, собранных с парафиновых срезов с последующей обработкой протеиназой К (Novagen, USA) либо выделенных из свежих операционных биопсий с использованием набора «Ампли Прайм ДНК-сорб-В» (производитель ООО «НекстБио», Россия). Мутации генов *BRAF* (15 экзон), *NRAS* (2, 3 экзоны), *KIT* (11, 13 и 17 экзоны) анализировали в ПЦР с последующим секвенированием на ABI PRISM 3100-Avant с помощью реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator Vol.3.1 [15, 16].

Результаты

В исследование включены 15 случаев меланомы с необычной клинико-морфологической картиной (табл. 1). Биопсийный материал получен от 8 женщин и 7 мужчин в возрасте от 27 до 78 лет (средний возраст – 42,4 года), причем 11 пациентов были моложе 50 лет.

В одном случае была исследована первичная беспигментная веретеноклеточная опухоль спины (пациент № 12), в 14 – поступивший материал представлял собой метастазы меланомы. Первичная опухоль располагалась на спине у 6 пациентов, на голени – у 2, в височной области головы или на шее – у 3 больных. У 4 пациентов имелись метастазы без выявленного первичного очага. Метастатические поражения представляли собой крупные узловые новообразования в мягких тканях в области спины либо нижней конечности, также метастазы поражали лимфоузлы, легкие, кожу, кости, печень. Большинство метастазов были лишены пигмента, но 6 метастатических опухолей были пигментосодержащими (табл. 1).

Диагностика опухолей практически во всех случаях вызвала сложности, чаще всего было необходимо дифференцировать меланому и саркому, в 1 случае предполагали лимфому. В частности, фигурировали следующие диагнозы: лимфома (№ 1), плейоморфная рабдомиосаркома (№ 3), меланоцитарная шваннома (№ 6), меланоцитарный фенотип круглоклеточной саркомы (№ 9), саркомоподобная меланома (№ 14), светлоклеточная недифференцированная плейоморфная саркома (№ 15).

При цитологическом исследовании препарата опухоли пациентки № 1 (рис. 1 а, б) обнаружены клетки преимущественно округлой формы с нежной структурой хроматина, которые ошибочно могут быть интерпретированы как клетки злокачественной лимфомы. При детальном изучении в отдельных клетках отмечалось наличие темных гранул пигмента (рис. 1 а, б). При исследовании клеток узловой изъязвленной беспигментной поверхностно распространенной меланомы пациентки № 13 клетки, типичные для меланомы, были немногочисленны, преимущественно выявлялись веретенообразные клетки и клетки с палочковидными ядрами, саркомоподобные, бедные пигментом (рис. 1 в–д).

Таблица 1

Фенотипы исследованных опухолей

Паци- ент	Пол	Воз- раст	Первичная локализа- ция	Первичный гистологи- ческий диагноз	Пигмента- ция	Гистологический тип	Мутационный статус метастаза
1	Ж	47	БВПО	Лимфома / Рак молоч- ной железы	Нет	Смешанный	BRAF/NRAS/KITWT
2	Ж	38	БВПО	Саркома / Меланома яичника с вращением в серозу тела матки	Нет	Эпителиоидно- клеточный	BRAF/NRAS/KIT WT
3	Ж	27	БВПО	Плеоморфная рабдо- миосаркома или злока- чественная фиброзная гистиоцитома	Нет	Смешанный	BRAF/NRAS/KIT WT
4	Ж	37	Голень	Меланома	Пигмента- ция	Эпителиоидно- клеточный	BRAF/NRAS/KIT WT
5	Ж	78	Спина	Саркома	Пигмента- ция	Веретеночлесточный / Узловая	BRAF/NRAS/KIT WT
6	М	34	Спина	Меланоцитарная шваннома / Саркома / Меланома	Пигмента- ция	Смешанный / Узло- вая	BRAF/NRAS/KIT WT
7	Ж	30	БВПО	Саркома	Нет	Смешанный	Ex-15 V600 ENRAS/KIT WT
8	М	49	Спина	Лимфома	Нет	Эпителиоидно- клеточный	Ex-15 V600 ENRAS/KIT WT
9	М	40	Спина	Саркома	Пигм	Веретеночлесточный / Узловая	BRAF/NRAS/KIT WT
10	М	30	Спина	Саркома	Нет	Эпителиоидно- клеточный	BRAF/NRAS/KIT WT
11	М	44	Височная область	Саркома	Пигмента- ция	Веретеночлесточный	BRAF/NRAS/KIT WT
12	Ж	72	Спина	Саркома	Нет	Веретеночлесточный	Ex-15 V600 ENRAS/KIT WT
13	Ж	68	Голень	Меланома	Нет	Эпителиоидно- клеточный / Узловая	BRAF/NRAS/ KIT WT
14	М	62	Височная область	Саркомоподобная меланома	Пигмента- ция	Эпителиоидно- клеточный	BRAF/NRAS/ KITWT
15	М	30	Задняя по- верхность шеи	Недифференциро- ванная плеоморфная саркома / Меланома	Нет	Смешанный	Ex-15 V600 ENRAS/KIT WT

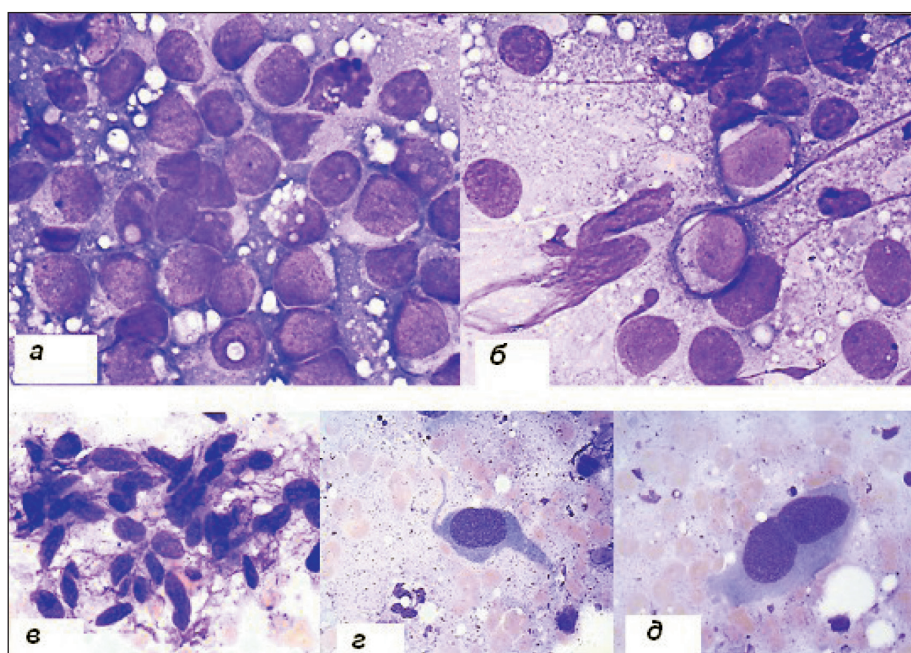


Рис. 1. Микрофото. Цитологические препараты опухолей пациенток № 1 (а, б) и 13 (в–д). ×400 (а, б, г, д), ×200 (в)

Таблица 2

Иммуногистохимическая характеристика опухолевых клеток пациентов

Пациент	Ki67	S100	Melan A	HMB 45	Н-кальдесон	Mitf	Тирозиназа	Панцито-кератин AE1/AE3	Цитокератин 5/6	P63	Гладкомышактин	EMA	Виментин	Хромогранин	РСК	CD99	Другие маркеры
1	3040 %	+/-	+/-	+/-	н/д	+Яд	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	+/-	+/-	н/д	Отриц. BCL2, MuM1, CD3, CD5, CD10, CD20, CD23, CD30, CD39, синаптофизин
2	6070 %	+/-	+/-	+	н/д	н/д	+	н/д	н/д	н/д	-	-	н/д	н/д	н/д	+	
3	67 50 %	+/-	+/-	+/-	+/-	+Яд.	+	-	-	-	н/д	-	-	н/д	н/д	+	
5	75 %	+/-	+/-	-	н/д	-	+	-	н/д	-	н/д	н/д	+/-	-	-	н/д	Отриц. синапто-физин
6		+	+	+	н/д	н/д	н/д	н/д	-	н/д	н/д	н/д	+	н/д	н/д	н/д	
7	50 %	+	н/д	+	н/д	-	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	+	н/д	н/д	н/д	

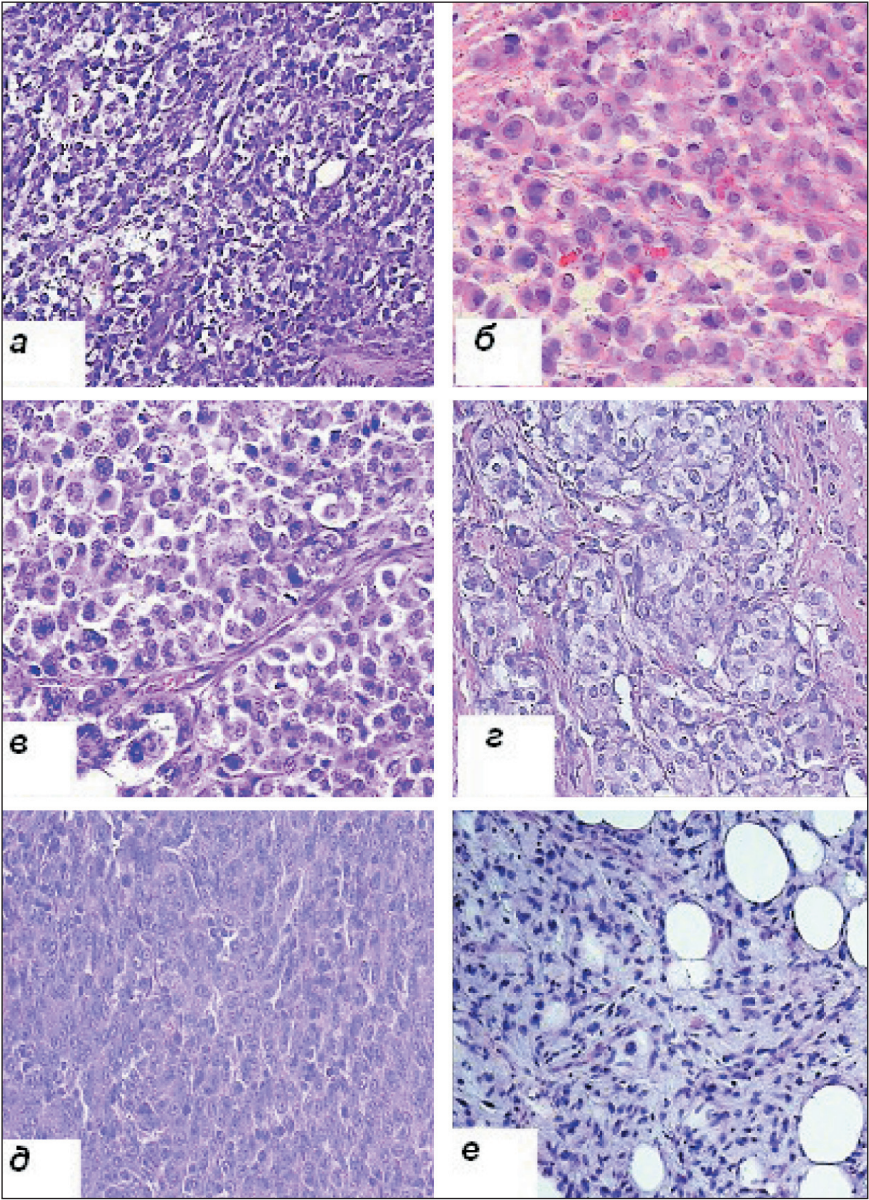


Рис. 2. Микрофото. Гистологические препараты опухолей пациентов № 1 (а), № 4 (б), № 13 (в), № 6 (г, д), № 14 (е). ×200

Гистологическое исследование показало разнородность опухолевых клеток, метастатические опухоли чаще имели смешанный фенотип, но встречались также эпителиоидные и веретенклеточные опухоли (табл. 1). В гистологическом препарате опухоли пациентки № 1 с множественными метастазами в легких, мягких тканях туловища и конечностей без выявленного первичного очага обнаружена атипия 1-го типа, присутствовали беспигментные округлые мелкие клетки смешанного гистогенеза (рис. 1 а). Эпителиоидный тип клеток был выявлен в метастатической полиморфноклеточной меланоме с атипией 3-го типа у пациентки № 4 (рис. 1 б) и в метастазе опухоли у пациентки № 13 (рис. 1 в) с изъязвленной поверхностно распространенной меланомой голени, хотя в цитологическом препарате у нее обнаруживали и веретенообразные клетки (рис. 1 в–д). У пациента № 6 в метастазе опухоли с первичным диагнозом меланоцитарная шваннома спины выявлены клетки смешанного гистотипа (рис. 2 г, д).

При иммуногистохимическом исследовании метастатических опухолей, диагностированных как саркома или лимфома, выявлены слабopоложительные реакции на S100, HMB 45, Melan A, MITF, тирозиназу, однако отсутствие экспрессии цитокератинов, p63 и гладкомышечного актина подтверждает диагноз меланомы (табл. 2).

С целью дифференциации саркомы от меланомы был проведен FISH-анализ 4 опухолей (№ 2, 6, 10, 11) для выявления возможной реаранжировки гена *EWSR1*, однако транслокация хромосомы 22q не обнаружена, что подтверждает диагноз меланомы.

Генетический анализ в ДНК 4 из 15 (27 %) опухолей выявил мутацию *BRAF* (p.V600E), мутации в генах *NRAS* и *KIT* не обнаружены (табл. 1). Любопытно, что все 4 опухоли (№ 7, 8, 12, 15) с мутацией *BRAF* были беспигментными. Выявление мутации *BRAF* в метастазах указывает, что первичной опухолью является меланома.

У 30-летней пациентки (№ 7) с метастатической опухолью в брюшной полости без выявленного первичного очага наличие мутации *BRAF* свидетельствует, что первичной опухолью является меланома. Мутация *BRAF* обнаружена также в первичной беспигментной веретенклеточной опухоли спины с саркомоподобной дифференцировкой у 72-летней пациентки (№ 12). Мутация *BRAF* обнаружена также в метастазе на коже головы у 30-летнего пациента № 15, возникшем через год после появления опухоли шеи. Это указывает на то, что первичная опухоль представляла собой светлоклеточную меланому, а не плеоморфную недифференцированную саркому, как предполагали ранее. У пациента № 8 с подозрением на лимфому мутация *BRAF* выявлена в лимфоузле через 6 лет после первичной опухоли, что указывает на метастазирование меланомы. Во всех случаях об-

наружение мутации *BRAF* подтверждает диагноз меланомы, поскольку мутации *BRAF* и *NRAS*, представленные в первичной опухоли, сохраняются и в последующих метастазах [14, 17].

Обсуждение

В данном исследовании охарактеризованы необычные случаи меланомы. Фенотипическая пластичность как первичной меланомы, так и метастазов хорошо известна. Некоторые меланомы утрачивают иммуногистохимические маркеры меланоцитарной дифференцировки [3, 4, 7], и это требует дифференциальной диагностики от морфологически сходных немеланоцитарных опухолей.

С другой стороны, известны случаи неполной дифференцировки или дедифференцировки злокачественной меланомы, как первичной, так и метастатической. При первичном диагнозе измененный фенотип такой опухоли принимают за рабдомиосаркому, миофибросаркому, аденокарциному или лейомиосаркому [3, 7]. A. Agaimy et al. описывают случаи, когда у пациентов с первичным диагнозом меланома через некоторое время (3 мес – 9 лет) возникала метастатическая опухоль с фенотипом саркомы, так как в ней выявили дедифференцированные метастазы, в которых экспрессия маркеров меланомы иммуногистохимически не определялась [7]. При этом в 10/14 (71 %) случаев в первичной опухоли и метастазе выявлены мутации *BRAF* (35 %) или *NRAS* (35 %). Метаанализ 24 недифференцированных меланом выявил мутации *BRAF* и *NRAS* в 33 % и 29 % опухолей соответственно [7].

В нашей работе мутации *BRAF* выявлены в 27 % случаев атипичной меланомы, мутации *NRAS* не обнаружены. Однако при исследовании более 200 образцов дифференцированной меланомы кожи мутации *BRAF* обнаружены в 60 %, а *NRAS* – в 14 % случаев [15, 16].

Важно отметить, что наличие мутаций *BRAF* или *NRAS* является доказательством меланоцитарной дифференцировки опухолей, фенотипически сходных с саркомами [18]. Известно, что в истинных саркомах такие мутации не встречаются. Более того, плеоморфизм и потеря дифференцировочных маркеров не характерны для светлоклеточных сарком.

В литературе довольно часто встречаются описания сложных случаев, когда необходимо дифференцировать беспигментную меланому от светлоклеточной саркомы мягких тканей. По морфологии злокачественная беспигментная меланома кожи может напоминать светлоклеточную саркому, причем эти опухоли существенно не различаются по профилю экспрессии молекулярных маркеров. C. Liu et al. [19] описали два случая светлоклеточной саркомы, локализованной на коже большого пальца левой руки и в тощей кишке, при диагностике которых возникли значительные

трудности. В обеих опухолях иммуногистохимически выявлялась диффузная экспрессия S100, виментина, белка NSE, и фокальная экспрессия антигенов CD56, MelanA. Использование чипов MassARRAY и панели OncoCarta 1.0 позволило авторам проанализировать 238 известных мутаций, локализованных в горячих точках 19 онкогенов, однако ни одной мутации выявлено не было. Доказательством светлоклеточной саркомы явились результаты ПЦР с обратной транскрипцией, подтвердившие транслокацию *EWS/ATF1* типа 1 в двух опухолях [19].

В.Р. Wagner et al. также описали случай диагностической дилеммы: светлоклеточной саркомы или беспиговой *BRAF*-негативной меланомы [20]. Положительное окрашивание на меланоцитарные маркеры S-100, HMB-45, MART-1, MITF вместе с результатами кариотипирования и FISH-анализа – отсутствием реаранжировки гена *EWS* – подтвердило диагноз беспиговой меланомы [20].

В настоящем исследовании мы попытались проанализировать нетипичные случаи меланомы со свойствами, характерными для сарком, что приводило к проблемам при первоначальной дифференциальной диагностике опухоли. У 6 пациентов описаны метастазы в мягких тканях или первичных опухолях в виде мягкотканого образования. У 4 пациентов первичный очаг меланомы не выявлен, и среди мягкотканых опухолей (первичных и метастазов) встречались беспиговые, что затрудняло дифференциальную диагностику меланомы или саркомы. Лишь у 4/15 пациентов выявлена мутация *BRAF* V600E, подтверждающая диагноз меланомы. С помощью иммуногистохимического окрашивания обнаружена слабopоложительная реакция на S100 и меланоцитарные маркеры Melan A, тирозиназу и частично HMB 45 и MITF, однако такая реакция возможна и при светлоклеточных саркомах. В четырех случаях (№ 2; № 6; № 10; № 11) с подозрением на саркому методом FISH

было выявлено отсутствие реаранжировки локуса *EWS1(20q12)* и диагноз саркомы был исключен.

Сообщается также о Melan A-негативных веретенообразных клетках, ассоциированных с меланомой [21]. Клинические последствия потери Melan A ограничены, но теоретически это может быть связано с менее зрелым и слабо дифференцированным подтипом меланомы. По мнению авторов, морфологические изменения в направлении к мезенхимальной и клеточной дедифференцировке меланомы могут коррелировать с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП). В процессе ЭМП клетки теряют эпителиальные характеристики (поляризационные, адгезивные) и приобретают мезенхимальные функции: веретеноклеточную гистологию и инвазивные свойства, связанные с менее зрелыми, дедифференцированными клетками [22].

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) является фундаментальной частью эмбриогенеза и связан с метастазированием раковых клеток. Меланоциты происходят из эктодермы и клеток нервного гребня, которые в эмбриогенезе подвергаются ЭМП и мигрируют до эпидермального слоя с последующей дифференцировкой в меланоциты [23]. Меланоциты и клетки меланомы часто имеют типичную эпителиальную морфологию с устойчивой экспрессией Е-кадгерина при закреплении с кератиноцитами в эпидермальном слое. Поэтому веретенообразная морфология и потеря Е-кадгерина могут быть связаны с более выраженным инвазивным фенотипом [21].

Полученные результаты позволяют предположить определенную неоднородность подгруппы меланом, которые имеют ряд морфологических и молекулярных особенностей, сближающих их с саркомами. Для выявления морфологических и молекулярных маркеров, которые позволят изучить и дифференцировать эти опухоли более детально, потребуются дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Мазуренко Н.Н. Молекулярно-генетические факторы и маркеры меланомы. Молекулярно-генетические маркеры опухолей. М., 2016. 85–128. [Mazurenko N.N. Molecular-genetic factors and markers of melanoma. Molecular-Genetic Tumor Markers. Moscow, 2016. 85–128. (in Russian)].
2. Leonardi G.C., Falzone L., Salemi R., Zanghi A., Spandidos D.A., McCubrey J.A., Candido S., Libra M. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). Int J Oncol. 2018 Apr; 52 (4): 1071–80. doi: 10.3892/ijo.2018.4287.
3. Magro C.M., Crowson A.N., Mihm M.C.Jr3. Unusual variants of malignant melanoma. Mod Pathol. 2006 Feb; 19 Suppl 2: S41–70. doi: 10.1038/modpathol.3800516.
4. Banerjee S.S., Eyden B. Divergent differentiation in malignant melanomas: a review. Histopathology. 2008 Jan; 52 (2): 119–29. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02823.x.
5. Ordóñez N.G. Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: a review and update. Hum Pathol. 2014 Feb; 45 (2): 191–205. doi: 10.1016/j.humpath.2013.02.007.
6. Pletneva M.A., Andea A., Palanisamy N., Betz B.L., Carskadon S., Wang M., Patel R.M., Fullen D.R., Harms P.W. Clear cell melanoma: a cutaneous clear cell malignancy. Arch Pathol Lab Med. 2014 Oct; 138 (10): 1328–36. doi: 10.5858/arpa.2014-0307-CC.

7. Agaimy A., Specht K., Stoeck R., Lorey T., Märkl B., Niedobitek G., Straub M., Hager T., Reis A.C., Schilling B., Schneider-Stock R., Hartmann A., Mentzel T. Metastatic Malignant Melanoma With Complete Loss of Differentiation Markers (Undifferentiated/Dedifferentiated Melanoma): Analysis of 14 Patients Emphasizing Phenotypic Plasticity and the Value of Molecular Testing as Surrogate Diagnostic Marker. Am J Surg Pathol. 2016 Feb; 40 (2): 181–91. doi: 10.1097/PAS.0000000000000527.
8. Kacerovska D., Michal M., Kutzner H., Rychnovsky J., Kazakov D.V. Metastatic desmoplastic malignant melanoma associated with low-grade myofibroblastic sarcoma. Am J Dermatopathol. 2009 Jul; 31 (5): 490–4. doi: 10.1097/DAD.0b013e31819afdaa.
9. Kiuru M., McDermott G., Berger M., Halpern A.C., Busam K.J. Desmoplastic melanoma with sarcomatoid dedifferentiation. Am J Surg Pathol. 2014 Jun; 38 (6): 864–70. doi: 10.1097/PAS.0000000000000201.
10. DiMaio S.M., Mackay B., Smith J.L. Jr, Dickersin G.R. Neurosarcomatous transformation in malignant melanoma: an ultrastructural study. Cancer. 1982 Dec 1; 50 (11): 2345–54.
11. Jalas J.R., Vemula S., Bezrookove V., Leboit P.E., Simko J.P., Bastian B.C. Metastatic melanoma with striking adenocarcinomatous differentiation illustrating phenotypic plasticity in melanoma. Am J Surg Pathol. 2011 Sep; 35 (9): 1413–8. doi: 10.1097/PAS.0b013e31822280d8.
12. Patel R.M., Downs-Kelly E., Weiss S.W., Folpe A.L., Tubbs R.R., Tuthill R.J., Goldblum J.R., Skacel M. Dual-color, break-apart fluorescence in situ hybridization for *EWS* gene rearrangement distinguishes clear cell

sarcoma of soft tissue from malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2005 Dec; 18 (12): 1585–90. doi: 10.1038/modpathol.3800503.

13. Hocar O., Le Cesne A., Berissi S., Terrier P., Bonvalot S., Vanel D., Auperin A., Le Pechoux C., Bui B., Coindre J.M., Robert C. Clear Cell Sarcoma (Malignant Melanoma) of Soft Parts: A Clinicopathologic Study of 52 Cases. *Dermatol Res Pract*. 2012; 2012: 984096. doi: 10.1155/2012/984096.

14. Doyle L.A. Non-mesenchymal Mimics of Sarcoma. *Surg Pathol Clin*. 2015 Sep; 8 (3): 493–513. doi: 10.1016/j.path.2015.05.010.

15. Mazurenko N.N., Tsyganova I.V., Lushnikova A.A., Ponkratova D.A., Anurova O.A., Cheremushkin E.A., Mikhailova I.N., Demidov L.V. Spectrum of oncogene mutations differs among melanoma subtypes. *Molecular Biology*. 2015; 49 (6): 917–923. doi: 10.1134/S0026893315060163.

16. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Лушников А.А., Анурова О.А., Понкратова Д.А., Вихрова А.Н., Утяшев И.А. Мутантный статус и некоторые клиничко-морфологические особенности меланомы кожи. *Российский онкологический журнал*. 2017; 22 (2): 60–65. [Mazurenko N.N., Tsyganova I.V., Lushnikova A.A., Anurova O.A., Ponkratova D.A., Vikhrova A.N., Utyashev I.A. Mutational status and some clinico-morphological features of cutaneous melanoma. *Russian Journal of Oncology*. 2017; 22 (2): 60–65. (in Russian)]. doi: 10.18821/1028-9984-2017-22-2-60-65.

17. Harbst K., Lauss M., Cirenajwis H., Winter C., Howlin J., Törnren T., Kvist A., Nodin B., Olsson E., Häkkinen J., Jirstrom K., Staaf J., Lundgren L., Olsson H., Ingvar C., Gruvberger-Saal S.K., Saal L.H., Jönsson G. Molecular and genetic diversity in the metastatic process of melanoma. *J Pathol*. 2014 May; 233 (1): 39–50. doi: 10.1002/path.4318.

18. Cipriani N.A., Letovanec I., Hornicek F.J., Mullen J.T., Duan Z., Borger D.R., Nielsen G.P. BRAF mutation in 'sarcomas': a possible method to detect de-differentiated melanomas. *Histopathology*. 2014 Apr; 64 (5): 639–46. doi: 10.1111/his.12305.

19. Liu C., Ren Y., Li X., Cao Y., Chen Y., Cui X., Li L., Li F. Absence of 19 known hotspot oncogenic mutations in soft tissue clear cell sarcoma: two cases report with review of the literature. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7 (8): 5242–5249.

20. Wagner B.P., Epperla N., Medina-Flores R. Diagnostic dilemma: late presentation of amelanotic BRAF-negative metastatic malignant melanoma resembling clear cell sarcoma: a case report. *Diagn Pathol*. 2013 Nov 25; 8: 192. doi: 10.1186/1746-1596-8-192.

21. Bonnelykke-Behrndtz M.L., Steiniche T., Damsgaard T.E., Georgsen J.B., Danielsen A., Bastholt L., Møller H.J., Norgaard P.H., Schmidt H. MelanA-negative spindle-cell associated melanoma, a distinct inflammatory phenotype correlated with dense infiltration of CD163 macrophages and loss of E-cadherin. *Melanoma Res*. 2015 Apr; 25 (2): 113–8. doi: 10.1097/CMR.0000000000000138.

22. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 2009 Jun; 119 (6): 1417–9. doi: 10.1172/JCI39675.

23. Acloque H., Adams M.S., Fishwick K., Bronner-Fraser M., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*. 2009 Jun; 119 (6): 1438–1449. doi: 10.1172/JCI38019.

Поступила/Received 27.06.18
Принята в печать/Accepted 15.10.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Михайлова Ирина Николаевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения биотерапии опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). E-mail: irmikhaylova@gmail.com. SPIN-код: 4271-2846. Researcher ID (WOS): Y-6159-2018. Author ID (Scopus): 8534967300. ORCID: 0000-0002-7659-6045.

Анурова Ольга Александровна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения патологической анатомии опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия).

Лушников Анна Александровна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории онкогеномики, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). ORCID: 0000-0002-7838-1005.

Цыганова Ирина Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории онкогеномики, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия).

Сендерович Анастасия Ильинична, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения патологической анатомии опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 4602-7378. Researcher ID (WOS): Y-5462-2018. Author ID (Scopus): 23096390400. ORCID: 0000-0003-2213-5785.

Кондратьева Татьяна Тихоновна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической цитологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 205571. Researcher ID (WOS): Y-5932-2018. Author ID (Scopus): 9234963800. ORCID: 0000-0002-0501-0326.

Демидов Лев Вадимович, доктор медицинских наук, заведующий отделением биотерапии опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 5362-6386. Author ID (Scopus): 173317. ORCID: 0000-0002-8562-6082.

Мазуренко Наталия Николаевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории онкогеномики, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Москва, Россия). ORCID: 0000-0003-4767-698.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Irina N. Mikhaylova, DSc, Leading Researcher, Department of Tumor Biotherapy, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia). E-mail: irmikhaylova@gmail.com. Researcher ID (WOS): Y-6159-2018. Author ID (Scopus): 8534967300. ORCID: 0000-0002-7659-6045.

Olga A. Anurova, DSc, Leading Researcher, Department of Pathological Anatomy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia).

Anna A. Lushnikova, DSc, Leading Researcher, Cancer Genomics Laboratory, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0002-7838-1005.

Irina V. Tsyganova, PhD, Senior Researcher, Cancer Genomics Laboratory, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia).

Anastasia I. Senderovich, PhD, Senior Researcher, Department of Pathological Anatomy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia). SPIN-код: 4602-7378. Researcher ID (WOS): Y-5462-2018. Author ID (Scopus): 23096390400. ORCID: 0000-0003-2213-5785.

Tatiana T. Kondratyeva, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Cytology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia). SPIN-код: 205571. Researcher ID (WOS): Y-5932-2018. Author ID (Scopus): 9234963800. ORCID: 0000-0002-0501-0326.

Lev V. Demidov, DSc, Head of the Department of Tumor Biochemistry, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia). SPIN-код: 5362-6386. Author ID (Scopus): 173317. ORCID: 0000-0002-8562-6082.

Natalia N. Mazurenko, DSc, Leading Researcher, Cancer Genomics Laboratory, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0003-4767-698.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Для цитирования: Максимова Н.А., Пржедецкий Ю.В., Хохлова О.В., Позднякова В.В., Ильченко М.Г., Максимова М.И. Ультразвуковое исследование при планировании операций по поводу меланомы кожи конечностей. Современное состояние вопроса. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18(1): 95–102. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-95-102.

For citation: Maksimova N.A., Przhedetsky Yu.V., Khokhlova O.V., Pozdnyakova V.V., Ilchenko M.G., Maksimova M.I. Ultrasound scan in planning surgery for cutaneous melanoma of the extremities. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18(1): 95–102. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-95-102.

УЛЬТРАЗВУКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИ ПЛАНИРОВАНИИ ОПЕРАЦИЙ ПО ПОВОДУ МЕЛАНОМЫ КОЖИ КОНЕЧНОСТЕЙ

Н.А. Максимова, Ю.В. Пржедецкий, О.В. Хохлова, В.В. Позднякова, М.Г. Ильченко, М.И. Максимова

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт»
Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Россия
Россия, г. Ростов-на-Дону, 344037, ул. 14-я линия, 63. E-mail: maximovanataly@mail.ru

Аннотация

Проведен ретроспективный анализ ультразвуковых исследований у 42 больных меланомой кожи конечностей при планировании закрытия кожного дефекта островковыми кожно-фасциальными лоскутами на перфорантных сосудах. Вначале выполнялось УЗИ первичного очага меланомы для уточнения характеристик кожи, опухоли, прилежащих тканей. Затем осуществлялся поиск перфорантных сосудов для их маркировки и определения расположения островковых лоскутов. УЗИ выполнены на экспертных аппаратах «IU 22 PHILIPS», GE «Logiq E9», «Supersonic imagine AIXPLORER multi Wave» линейными мультисекторными датчиками (5–17 МГц) в В-режиме, цветовом и энергетическом картировании кровотока. Уточнены критерии необходимых и достаточных параметров по результатам сонодоплерографической визуализации для хирургического лечения меланомы кожи конечностей по предлагаемому способу в предоперационном периоде и мониторинг состояния лоскутов после операции. Было установлено, что перемещение лоскутов на перфорантных сосудах не приводило к нарушениям кровотока в них: до операции средняя скорость артериального кровотока составила $13,1 \pm 4,7$ см/с, после операции – $12,8 \pm 5,4$ см/с. Максимальная венозная скорость до операции в среднем была $7,0 \pm 1,3$ см/с, после операции – $6,2 \pm 0,8$ см/с. Таким образом, триплексное сканирование значительно облегчает выбор и индивидуальный дизайн лоскута с включением в него питающих сосудов достаточного потенциала, существенно помогает в планировании операции, снижает риск неудач и способствует улучшению результатов лечения. Данный метод способствует повышению радикальности хирургического вмешательства с одновременным снижением риска послеоперационных осложнений, ускорением медицинской и социальной реабилитации больных.

Ключевые слова: ультразвуковое исследование, кожно-фасциальный лоскут, перфорантные сосуды, меланوما кожи, реконструктивно-пластическая операция, сонодоплерография, перфорантные лоскуты, послеоперационный период, триплексное УЗ сканирование.

ULTRASOUND SCAN IN PLANNING SURGERY FOR CUTANEOUS MELANOMA OF THE EXTREMITIES

Н.А. Maksimova, Yu.V. Przhedetsky, O.V. Khokhlova, V.V. Pozdnyakova, M.G. Ilchenko, M.I. Maksimova

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia
Russia, 344037-Rostov-on-Don, 14th liniya, 63. E-mail: maximovanataly@mail.ru

Abstract

We performed a retrospective analysis of ultrasound scans in 42 patients with cutaneous melanoma of the extremities in planning the closure of skin defects with skin fascial island flaps supplied by perforating vessels. First, the primary melanoma focus was scanned by ultrasound to reveal characteristics of the skin, tumor and adjacent tissues. Then we detected perforating vessels to mark them and to select the sites for the island flaps. Ultrasound examination was performed using the IU 22 PHILIPS, GE Logiq E9 and Supersonic imagine

AIXPLORER MultiWave Systems with linear multi-frequency sensors (517 MHz) in the B-mode, color and power Doppler to visualize the blood flow. We clarified the criteria of the necessary and sufficient parameters according to Doppler ultrasound visualization for surgical treatment of cutaneous melanoma of the extremities by the suggested method in preoperative period, as well as monitoring of the flap state after surgery. The transfer of flaps on perforating vessels did not cause blood flow disorders in them: the mean arterial blood flow velocity was 13.1 ± 4.7 cm/sec before surgery and 12.8 ± 5.4 cm/sec after it. The maximal venous flow velocity was on average 7.0 ± 1.3 cm/sec before surgery and 6.2 ± 0.8 cm/sec after it. Thus, triplex ultrasound significantly facilitates the selection and individual design of the flap with the inclusion of feeding vessels of sufficient potential, helps in planning the operation, reduces the risk of failure and improves the results of treatment. This method contributes to the radicalization of surgical intervention with a simultaneous decrease in the risk of postoperative complications and acceleration of medical and social rehabilitation of patients.

Key words: ultrasound examination, skin fascial flap, perforating vessels, cutaneous melanoma, reconstructive plastic surgery, Doppler ultrasound, perforating flaps, postoperative period, triplex ultrasound scan.

Введение

Меланома кожи является одной из самых агрессивных злокачественных опухолей человека с непредсказуемым течением. Хотя удельный вес ее составляет не более 10 % среди всех форм ЗНО кожи, она является причиной 80 % летальных исходов в данной группе пациентов [1, 2]. Частота возникновения злокачественной меланомы в различных странах мира возрастает в среднем в 2 раза каждые 15 лет [3].

Ведущим этапом комплексного лечения меланомы кожи является хирургический метод. При широком иссечении меланомы кожи зачастую появляются сложности закрытия возникающего дефекта [2]. Наиболее проблемной зоной для пластического закрытия кожного дефекта является область верхних и нижних конечностей, при том, что доля больных с данной локализацией опухоли составляет 73,4 %. Местных тканей, как правило, оказывается недостаточно, а выполнение свободной кожной пластики ограничено из-за неблагоприятных условий приживления свободного лоскута, обусловленных особенностями ложа трансплантата и трудностями иммобилизации и фиксации лоскута [4].

Сохранение жизнеспособности перемещенных тканевых фрагментов с их первичным приживлением в воспринимающем ложе – одна из стратегических задач пластической операции. Ее эффективное решение в значительной степени зависит от точной оценки кровообращения в перемещаемых тканях, а также от тщательности планирования операции [5].

В зарубежной литературе встречается много сообщений об успешном применении перфорантных лоскутов для закрытия мягкотканых дефектов конечностей [6]. Немаловажно, что формирование таких лоскутов не связано с большой травматизацией донорской зоны, а значит, сопровождается непродолжительным послеоперационным периодом. Сложность затрагиваемой проблемы инициировала поиск наиболее оптимальных хирургических вмешательств при данной локализации опухоли. Для подобных ситуаций возможно применение способа замещения возникающих дефектов островковыми

кожно-фасциальными лоскутами на перфорантных сосудах.

Лоскуты произвольной формы являются наиболее частыми видами пластического материала, используемого для реконструкции на уровне подкожного жира (эпифасциальные) или на уровне фасции (субфасциальные). Их артериальное кровоснабжение осуществляется перфорирующими мышечно-кожными сосудами основания лоскута, исходящими из сегментарных сосудов, лежащих под мышцей, и проникающими через фасцию в подкожный слой. Кровоток в свободной части лоскута обеспечивается анастомозами между глубоким дермальным-субдермальным сплетением и более поверхностным сплетением сосочкового слоя дермы. От точности представлений о локализации питающих лоскут сосудов могут зависеть продолжительность операции, ее травматичность и даже возможность успешного выделения комплекса тканей [5].

Цель исследования – изучение возможностей ультразвукового исследования в планировании этапов хирургического лечения меланомы кожи конечностей.

Материал и методы

В исследовании 42 больным меланомой кожи конечностей закрытие кожного дефекта выполнялось островковыми лоскутами на перфорантных сосудах. Критериями отбора пациентов были размеры опухоли, по ширине не превышающие 1/3 диаметра конечности, наличие перфорантных сосудов в зонах интереса. Большинство пациентов составили женщины – 24 (57,2 %), мужчины – 18 (42,8 %). Возраст больных находился в диапазоне от 23 до 78 лет. Поверхностная форма меланомы наблюдалась у 5 (11,9 %) больных, узловая форма – у 37 (88,1 %). По локализации злокачественных новообразований кожи конечностей больные были распределены следующим образом: голень – 19 (45,2 %) больных, предплечье – 12 (28,5 %), плечо – 7 (16,6 %), бедро – 4 (9,5 %) пациента. Стадия процесса уточнялась после гистологического исследования первичного очага меланомы. В зависимости от уровня инвазии по Clark и толщины опухоли по

Breslow I стадия диагностирована – у 6 (14,3 %) пациентов, II стадия – у 14 (33,3 %), III стадия – у 22 (52,4 %) больных.

Ультразвуковые исследования первичного очага меланомы и предлагаемой донорской зоны – поиск перфорантных сосудов с оценкой кровоснабжения будущих лоскутов, а также в послеоперационном периоде, на 5–7-е сут, в режимах ЦДК, ЭДК, ДМ выполнялись на аппаратах «IU 22 PHILIPS», GE «Logiq E9», «Supersonic imagine AIXPLORER multi Wave» широкополосными линейными мультисекторными датчиками с диапазоном частот 5–17 МГц. При планировании операции оценку будущего раневого дефекта осуществляли на основании принципов онкохирургии с учетом размеров, формы, глубины инвазии опухоли и состояния тканей с учетом перенесенных операций, лучевой терапии и других факторов.

При УЗИ первичного очага на первом этапе оценивали: 1) толщину неизменной кожи в зоне

локализации образования; 2) форму образования, (округлая, правильная, неправильная), глубину инвазии опухоли – эпидермальная, внутрикожная, подкожная; 3) размеры образования – ширина, толщина; 4) эхогенность и структуру образования; 5) нижнюю границу образования (без инвазии, инвазия в кожу или подкожную клетчатку); 6) качественные и количественные гемодинамические параметры кровотока сосудов внутри опухоли. При ЦДК и ЭДК оценивалось количество локусов кровотока (цветовых пикселей), топография зон неоваскуляризации (центральная, периферическая, смешанная) и интенсивность кровотока (гипоинтенсивная, изоинтенсивная, гиперинтенсивная). При спектральной доплерографии изучались такие показатели кровотока, как максимальная систолическая скорость (MAC) (низкая – до 5 см/с, средняя – 5,1–10,0 см/с, высокая – от 10,1 см/с и более) и тип кровотока (артериальный, венозный) (рис. 1–4) [7].

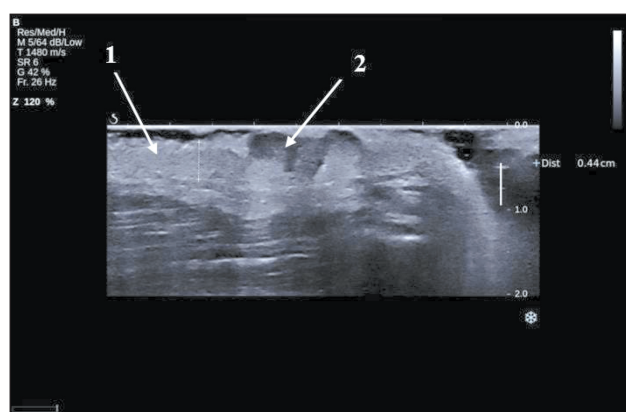


Рис. 1. Эхограмма в В-режиме мягких тканей левого плеча. Измерение толщины интактной кожи вблизи образования (0,44 см). Интактная кожа (стрелка 1), образование (стрелка 2)

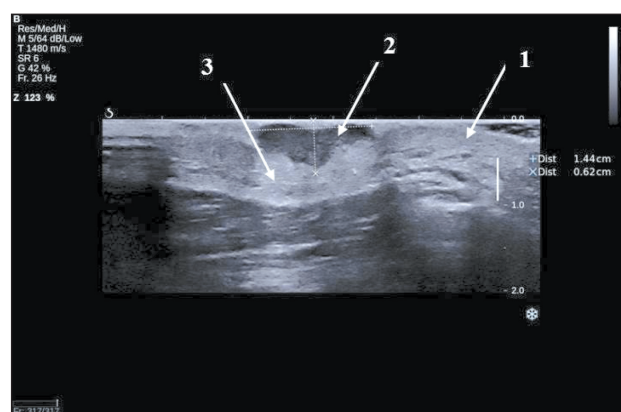


Рис. 2. Эхограмма новообразования кожи в В-режиме. Форма образования округлая неправильная с внутрикожной локализацией, размеры образования 1,44×0,63 см, пониженная эхогенность, неоднородная эхо-структура, нижняя граница образования достигает клетчатки. Интактная кожа (стрелка 1), образование (стрелка 2), подкожная жировая клетчатка (стрелка 3)

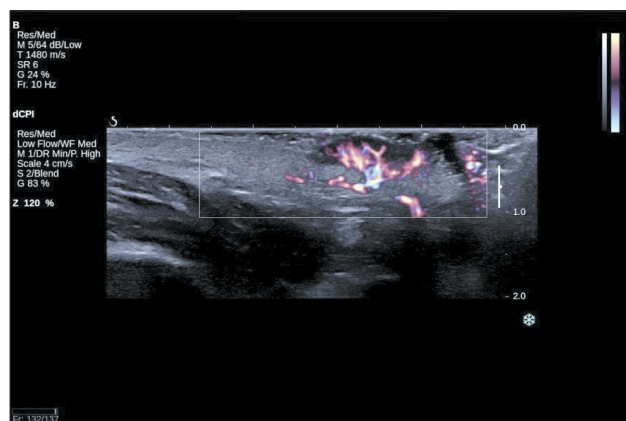


Рис. 3. Эхограмма образования кожи в режиме ЭДК: гиперваскуляризация в центральной и периферической зонах образования, перифокальных латеральных и горизонтальных областях

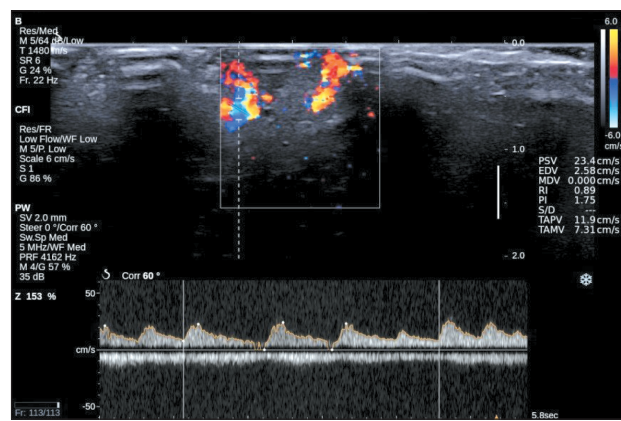


Рис. 4. Эхограмма образования кожи в режиме ЦДК при ДГ: регистрируется артерио-артериальный кровоток с высокой MAC в сосудах опухоли (23,4 см/с)

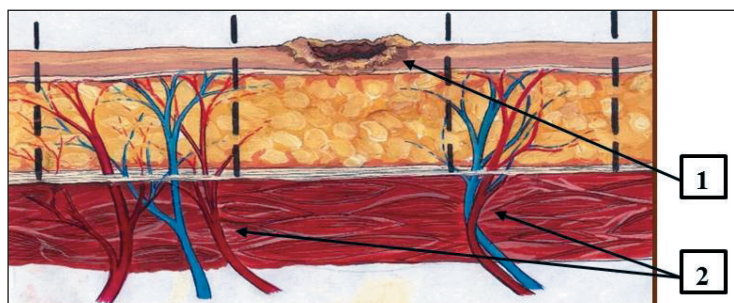


Рис. 5. Предоперационная разметка с учетом ангиоархитектоники донорской зоны. Опухоль (стрелка 1), перфорантные сосуды (стрелка 2)

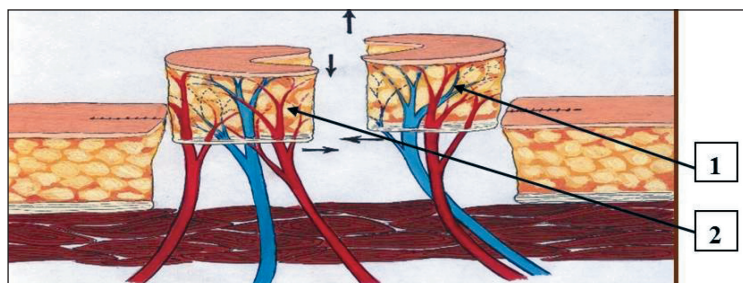


Рис. 6. Удален патологический очаг, выкроены и мобилизованы подковообразные лоскуты на перфорантных сосудах. Стрелками 1, 2 указаны кожно-мышечные лоскуты на перфорантных сосудах

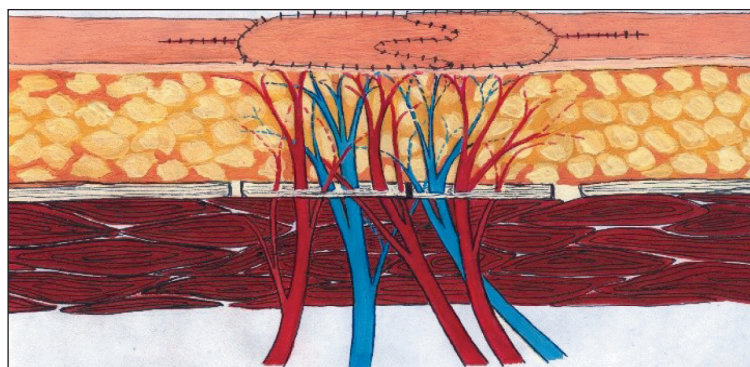


Рис. 7. Послеоперационный дефект закрыт, донорские раны ушиты

В предоперационном периоде выполняли предварительную разметку. Принимая во внимание непостоянство сосудистой анатомии конечностей, непосредственно перед операцией выполняли ультразвуковую доплерографию и доплерометрию предполагаемой донорской зоны с целью детекции перфорантных сосудов. При визуализации перфоранта, используя цветное и энергетическое доплеровское картирование, изучались качественные и количественные параметры гемодинамики предполагаемой донорской зоны (размеры, число и тип сосудов). При этом применялась методика мультилокусной доплерометрии с учетом параметров максимальных артериальных (максимальная артериальная скорость – МАС) и венозных потоков (максимальная венозная скорость – МВС). Далее производили маркировку выявленных перфораторов на коже под УЗ-контролем, корректировали разметку лоскутов, принимая во внимание ангиоархитектонику донорской зоны (рис. 5).

Под местной анестезией производили иссечение патологического очага, отступая на расстояние, обеспечивающее радикальность его удаления. На противоположных сторонах дефекта, учитывая расположение перфорантных сосудов, выкраива-

ли треугольные или подковообразные лоскуты. Лоскуты подвергались дальнейшей мобилизации путем просечения клетчатки и мышечной фасции, затем тупым путем отделяли кожно-фасциальный лоскут от подлежащих тканей с сохранением целостности питающих сосудов (рис. 6).

Осуществляли тщательный гемостаз в биполярном режиме. Это принципиальное положение, так как использование монополярной коагуляции неизбежно повлечет коагуляцию питающих перфорантных сосудов. Состояние кровообращения выделенных на сосудистых ножках лоскутов определяли с помощью двух основных клинических симптомов: цвета кожи и капиллярного ответа на пальцевое прижатие. После этого лоскуты смещали к центру, укрывали область дефекта прямо или со смещением и сшивали одиночными швами между собой. Края донорской раны мобилизовывали, дистальные отделы ушивали одиночными швами, до появления легкого натяжения, далее лоскуты вшивали одиночными швами в оставшийся раневой дефект (рис. 7). Пространство под лоскутами дренировали резиновыми выпускниками для предотвращения компрессии сосудистой ножки раневым отделяемым. Швы снимали на 12–16-е сут.

В ходе исследования мы пришли к выводу, что наиболее экономичным является циркулярный разрез, так как он позволяет отступить от патологического очага на равное расстояние со всех сторон без напрасного удаления интактных окружающих тканей.

На 5–7-е сут послеоперационного периода в режимах ЦДК, ЭДК производилась регистрация параметров пульсовой волны в перемещенных лоскутах, что давало возможность оценить функцию перфорантных сосудов.

Результаты и обсуждение

Меланомы кожи характеризовались пониженной экзогенностью в 100 % наблюдений. УЗИ первичного очага меланомы кожи позволило определить степень распространенности опухоли и глубину инвазии по Breslow (точность – 92,3 %) [8]. Поверхностно-распространяющиеся меланомы кожи в 100 % наблюдений имели аваскулярный тип изображения в режимах ЦДК, ЭДК. Узловые формы меланомы кожи характеризовались наличием артерио-артериального типа кровотока (100 %) высокой и средней интенсивности (95 %). Типичным изображением в режимах ЦДК, ЭДК для узловых меланом кожи был специфический ультразвуковой признак – разветвленная сосудистая сеть с множественными сосудами разнокалиберных диаметров с патологическими анастомозами и псевдопульсацией, типичными для неоангиогенеза. У пациентов с узловой формой меланомы диапазон

максимальных артериальных скоростей составил от 5,3 до 47,8 см/с с индексом периферического сосудистого сопротивления 0,2–0,7 (среднее значение ИР – 0,45). Данные доплеровские критерии расценены как надежные диагностические признаки узловой меланомы кожи.

Нами чаще использовались непостоянные перфорантные сосуды, что было связано с многообразием локализации патологического процесса, а также меньшим постоянством сосудистой топографии конечностей по сравнению с туловищем. Таким образом, планировать реконструктивно-пластическую операцию без предварительного доплерографического контроля сосудов донорской области невозможно, результат может оказаться непредсказуемым. Наиболее постоянными перфорантными сосудами топографически в ходе исследования явились следующие:

- 1) на передней поверхности бедра – перфоранты бедренной и коленных артерий;
- 2) на латеральной поверхности бедра – перфоранты глубокой бедренной артерии;
- 3) на задней поверхности бедра – перфоранты подколенной артерии и медиальной артерии, огибающей бедренную кость (табл. 1).

Внутренний диаметр перфорантных сосудов колебался от 1 до 3 мм (рис. 8) (табл. 2, 3). Нами использовались артериальные перфоранты, диаметр которых превышал 1 мм. Линейная скорость кровотока варьировала от 5 см/с до 28 см/с (в среднем – $13,1 \pm 4,7$ см/с), МВС – от 5 до 9 см/с

Таблица 1

Особенности топографической анатомии перфорантных артерий конечностей

Локализация сосудов	Кол-во перфорантных артерий	Топография перфорантных артерий	
		Постоянная	Непостоянная
Плечо	27	10 (37,1 %)	17 (62,9 %)
Предплечье	51	16 (31,4 %)	35 (68,6 %)
Бедро	12	5 (41,7 %)	7 (58,3 %)
Голень	49	8 (16,4 %)	41 (83,6 %)
Всего	139	39 (28,1 %)	100 (71,9 %)

Таблица 2

Распределение перфорантных артерий по диаметру

Диаметр перфорантных артерий, мм	Абсолютное число перфорантных артерий (n=110)
1,0–1,6	58 (52,7 %)
1,7–2,3	38 (34,6 %)
2,4–3,0	14 (12,7 %)

Таблица 3

Распределение перфорантных вен по диаметру

Диаметр перфорантных вен, мм	Абсолютное число перфорантных артерий (n=106)
1,0–1,6	43 (40,6 %)
1,7–2,3	42 (39,6 %)
2,4–3,0	21 (19,8 %)

Таблица 4

Допплерометрические параметры максимальной артериальной скорости кровотока в перфорантных артериях до и после операции

Максимальная артериальная скорость, см/с	До операции (n=110)	После операции (n=110)
5–8	7	8
9–12	32	35
13–16	39	37
17–20	27	26
21–24	5	4
Среднее значение	$13,1 \pm 4,7$	$12,8 \pm 5,4$

Таблица 5

Допплерометрические параметры максимальной венозной скорости кровотока в перфорантных венах до и после операции

Максимальная венозная скорость, см/с	До операции (n=106)	После операции (n=106)
5	7	8
6	29	28
7	34	35
8	32	31
9	4	4
Среднее значение	$7,0 \pm 1,3$	$6,2 \pm 0,8$

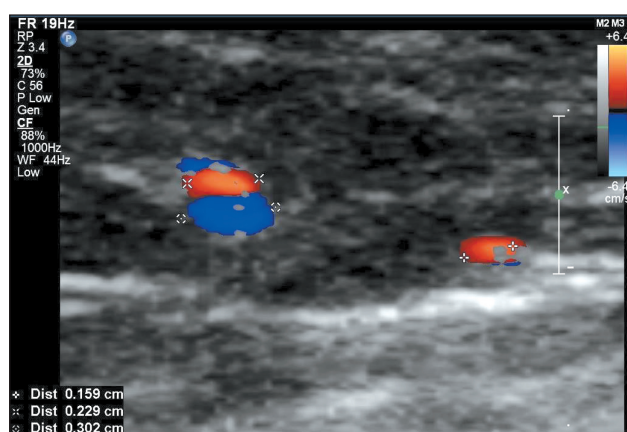


Рис. 8. Эхограмма мягких тканей плеча в режиме ЦДК: визуализируются три перфорантных сосуда, диаметром 0,16, 0,23 и 0,3 см

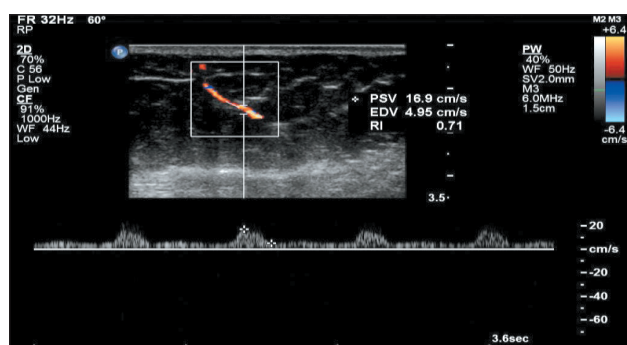


Рис. 9. Эхограмма перфорантной артерии в режиме ЦДК – пиковая систолическая скорость (PSV) 16,9 см/с, конечная диастолическая скорость (EDV) 4,95 см/с, ИР=0,71

(в среднем – $7,0 \pm 1,3$ см/с), ИР – от 0,7 до 1,0 (в среднем – $0,8 \pm 0,14$) (рис. 9).

В послеоперационном периоде на 5–7-е сут проводили контрольное УЗИ с определением параметров кровотока перфорантных сосудов. После операции не наблюдалось гемодинамически значимых нарушений кровотока (табл. 4, 5).

При оценке хирургических результатов учитывались послеоперационные осложнения. Из них наиболее частыми явились преходящая тотальная ишемия одного из встречных лоскутов, которая развилась в 5 (11,9 %) наблюдениях, и краевой некроз дистального лоскута – в 3 (7,1 %) случаях. Ишемия во всех случаях была ликвидирована на 5–7-е сут. Вероятно, основной причиной ишемических изменений при этом способе пластики явилось нарушение трофики лоскутов вследствие атеросклеротической трансформации и/или натяжения сосудов. При этом во всех случаях раны зажили без дополнительных хирургических вмешательств. На функциональные и косметические результаты эти осложнения повлияли незначительно. Полного некроза лоскута не наблюдалось.

При оценке эстетических результатов предложенного метода можно отметить, что пациенты были в большей степени удовлетворены внешним видом послеоперационных рубцов (92,8 %). Как правило, формировался нормотрофический эластичный рубец, ширина которого после созревания не превышала 0,3 см.

В онкологии одним из основных критериев оценки эффективности любого метода лечения

являются результаты безрецидивной выживаемости. В данном случае в течение 2 лет ни в одном наблюдении не возникли местные рецидивы.

Таким образом, предлагаемый способ использует площадь окружающей кожи на 100 %. При этом удаляется только потенциально скомпрометированная кожа вокруг патологического очага. Лоскуты, васкуляризированные перфорантными сосудами, обладают высокой жизнеспособностью, идентичны по цвету и текстуре коже реципиентной области. Непосредственная близость к воспринимательной зоне способствует минимальной деформации донорской области.

В настоящее время УЗИ с режимами ЭДК, ЦДК является основным методом предоперационной диагностики зон выхода перфораторов из мышцы в жировую клетчатку, так как является доступным, информативным, недорогим, неинвазивным исследова-

нием, которое позволяет определить не только топографию, но и тип сосуда, диаметр, а также скоростные характеристики кровотока.

Выводы

Триплексное УЗ-сканирование значительно облегчает выбор и индивидуальный дизайн лоскута с включением питающих сосудов достаточного диаметра, существенно помогает при планировании операции и послеоперационном контроле, что снизит риск неудач и способствует улучшению клинических и эстетических результатов лечения. Данный метод способствует повышению радикальности хирургического вмешательства, со снижением частоты послеоперационных осложнений, улучшением эстетико-функциональных результатов, а, следовательно, и ускорением медицинской и социальной реабилитации больных.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Пак Д.Д., Лазутина Т.Н. Опухоли кожи. Онкология, национальное руководство. М., 2014. 848–863. [Pak D.D., Lazutina T.N. Skin Tumors. Oncology, National Guideline. Moscow, 2014. 848–863. (in Russian)].
2. Кит О.И., Дашкова И.Р., Ващенко Л.Н. Использование реконструктивно-пластических операций в лечении злокачественных опухолей. Новочеркасск. 2017; 192–202. [Kit O.I., Dashkova I.R., Vashchenko L.N. The use of reconstructive plastic surgery in the treatment of malignant tumors. Novocherkassk. 2017; 192–202. (in Russian)].
3. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin. 2015 Jan-Feb; 65 (1): 5–29. doi: 10.3322/caac.21254.
4. Азимова Р.Б., Соболевский В.А. Перфорантные лоскуты в хирургическом лечении злокачественных опухолей кожи и мягких тканей голени и стопы. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. 2016; 2: 54–60. [Azimova R.B., Sobolevsky V.A. Propeller perforator flaps in distal lower leg: evolution and clinical applications. Sarcomas of Bones, Soft Tissues and Skin Tumors. 2016; 2: 54–60. (in Russian)].
5. Гарелик Е.И., Гилева К.С., Абдуллаев К.Ф., Васильев Е.А., Орлова Е.В. Топографо-анатомическое исследование переднебокового лоскута бедра на перфорантных сосудах. Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. 2016; 4: 20–26. [Garelik E.I., Gileva K.S., Abdullaev K.F., Vasiliev E.A., Orlova E.V. Anatomic exploration of the anterolateral thigh perforator flap. Annals of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 2016; 4: 20–26. (in Russian)].
6. Hwang K.T., Kim Y.H. Double skin perforator flaps for aesthetic resurfacing of extensive limb defects. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2015 Feb; 68 (2): e47–9. doi: 10.1016/j.bjps.2014.10.051.
7. Максимова Н.А., Позднякова В.В., Курьшова М.И., Ильченко М.Г. Ультразвуковая диагностика меланоцитарных образований кожи. Современные проблемы науки и образования. 2015; 3: 182. [Maksimova N.A., Pozdnyakova V.V., Kuryshova M.I., Ilchenko M.G. Ultrasound diagnosis of melanocytic skin neoplasms. Modern Problems of Science and Education. 2015; 3: 182. (in Russian)].
8. Аллахвердян Г.С., Чекалова М.А. Дооперационная диагностика первичной меланомы кожи при ультразвуковом исследовании. Ультразвуковая и функциональная диагностика. Приложение к журналу. Тезисы VII Съезда Российской ассоциации специалистов ультразвуковой диагностики в медицине. Часть I. 2015; 4: 16. [Allakhverdyan G.S., Chekalova M.A. Preoperative diagnosis of primary melanoma of the skin with ultrasound. Ultrasound and Functional Diagnostics. Supplement. Part I. 2015; 4: 16. (in Russian)].

Поступила/Received 30.07.18
Принята в печать/Accepted 27.11.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Максимова Наталья Александровна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая радиоизотопной лабораторией с группой УЗИ диагностики, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Россия). E-mail: maximovanataly@mail.ru. SPIN-код: 1785-9046.

Пржедецкий Юрий Валентинович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением опухолей кожи, мягких тканей и молочной железы № 2, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Россия). E-mail: yugurg@gmail.com. SPIN-код: 3888-6265.

Хохлова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела опухолей мягких тканей и костей, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Россия). E-mail: maria_ilchenko80@mail.ru. SPIN-код: 9529-9680.

Позднякова Виктория Вадимовна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела опухолей мягких тканей и костей, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Россия). E-mail: barsuk74@yandex.ru. SPIN-код: 7306-2034.

Ильченко Мария Геннадьевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела диагностики опухолей, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Россия). E-mail: maria_ilchenko80@mail.ru. SPIN-код: 2856-7946.

Максимова Мария Игоревна, врач-онколог, аспирант, ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России (г. Ростов-на-Дону, Россия). E-mail: mafania88@gmail.com.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Natalia A. Maksimova, MD, DSc, Professor, Head of Radioisotope Laboratory with Ultrasound Diagnostics Group, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: maximovanataly@mail.ru.

Yuriy V. Przhedetsky, MD, DSc, Professor, Head of Department of Skin, Soft Tissue and Breast Tumors No. 2, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: yurypr@gmail.com.

Olga V. Khokhlova, MD, PhD, Senior Researcher, Department of Soft Tissue and Bone Tumors, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: maria_ilchenko80@mail.ru.

Viktoria V. Pozdnyakova, MD, DSc, Professor, Leading Researcher, Department of Soft Tissue and Bone Tumors, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: barsuk74@yandex.ru.

Maria G. Ilchenko, MD, PhD, Researcher, Department of Tumor Diagnostics, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: maria_ilchenko80@mail.ru.

Maria I. Maksimova, MD, Oncologist, Postgraduate, Rostov Research Institute of Oncology (Rostov-on-Don, Russia). E-mail: mafania88@gmail.com.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-103-115

УДК: 616.367-006.6-08

Для цитирования: Францев Д.Ю., Сергеева О.Н., Долгушин Б.И. Лечение гиллюсной холангиокарциномы. Современное состояние вопроса. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 103–115. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-103-115.

For citation: Frantsev D.Yu., Sergeeva O.N., Dolgushin B.I. Therapy for hilar cholangiocarcinoma. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 103–115. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-103-115.

ЛЕЧЕНИЕ ГИЛЛЮСНОЙ ХОЛАНГИОКАРЦИНОМЫ. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА

Д.Ю. Францев, О.Н. Сергеева, Б.И. Долгушин

НИИ клинической и экспериментальной радиологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Н.Н. Блохина» МЗ России, г. Москва, Россия
Россия, г. Москва, 115478, Каширское шоссе, 24. E-mail: frantsev_d@mail.ru

Аннотация

Цель исследования – представить методы билиарной декомпрессии и специфического противоопухолевого лечения гиллюсной холангиокарциномы (опухоли Клацкина), проанализировав их сильные и слабые стороны. **Материал и методы.** Проведен поиск доступных литературных источников, опубликованных в базах Pubmed, Medline, Elibrary и др. Для написания данного обзора было найдено и использовано 118 источников, опубликованных с 1921 по 2018 г. **Результаты.** Гиллюсная холангиокарцинома – редкая и тяжело протекающая злокачественная опухоль гепатопанкреатобилиодуоденальной зоны, отличающаяся медленным перидуктальным инфильтративным ростом и поздним метастазированием, приводящая к летальному исходу чаще всего из-за локальных осложнений. Оптимальным методом дренирования желчного дерева при этой патологии на данный момент является чрескожная чреспеченочная холангиостомия (ЧЧХС) без последующей установки билиарных эндопротезов. ЧЧХС – наиболее безопасная, технически доступная методика с воспроизводимым результатом. Транспиллярная декомпрессия при опухоли Клацкина технически выполнима лишь в 40 % случаев. Среди специфических противоопухолевых методов единственным радикальным считается хирургическая резекция желчных протоков в сочетании с обширными резекциями печени. При этом результаты хирургического лечения сложно назвать удовлетворительными, а большинство пациентов и вовсе являются неоперабельными. В связи с этим все более широкое распространение получают локорегионарные технологии, среди которых наиболее известными являются лучевая терапия, радиочастотная абляция и фотодинамическая терапия (ФДТ). Среди локальных методик предпочтение следует отдавать ФДТ в связи с ее безопасностью, эффективностью, возможностью многократного повторения процедур, а также технической и финансово-экономической доступностью. **Заключение.** Современные подходы к лечению идеологически мало отличаются от предложенных первыми исследователями в середине XX века и сводятся к ликвидации билиарной стриктуры и поддержанию нормального пассажа желчи в течение максимально возможного времени. Однако, несмотря на стратегическую стагнацию, достигнуты значительные тактические успехи, которые позволили добиться кратного увеличения продолжительности жизни ранее считавшихся инкурабельными больных.

Ключевые слова: опухоль Клацкина, гиллюсная холангиокарцинома, локорегионарные технологии, билиарная стриктура, билиарная декомпрессия, противоопухолевое лечение, продолжительность жизни, эпидемиология, внепеченочные желчные протоки, рост опухоли, чрескожная чреспеченочная холангиостомия, транспиллярная декомпрессия.

THERAPY FOR HILAR CHOLANGIOCARCINOMA

D.Yu. Frantsev, O.N. Sergeeva, B.I. Dolgushin

Clinical and Experimental Radiology Research Institute, N.N.Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia
24, Kashirskoe shosse, 115478-Moscow, Russia. E-mail: frantsev_d@mail.ru

 Францев Дмитрий Юрьевич, frantsev_d@mail.ru

Abstract

Purpose: to present different modalities of biliary decompression and specific antitumor treatment of hilar cholangiocarcinoma (Klatskin tumor). **Material and Methods.** The review was based on 318 publications available from Pubmed, Medline, Elibrary, etc. in the interval time between 1921-2018. **Results.** Hilar cholangiocarcinoma is a rare hepatobiliary malignancy with dismal prognosis demonstrating slow periductal infiltrative growth, late metastasis and causing death mainly due to local complications. Percutaneous transhepatic biliary drainage (PTBD) is the optimal way of biliary decompression for malignant hilar strictures nowadays. PTBD is the safest, technically accessible technique with reproducible results. Transpapillary decompression in Klatskin tumor patients is technically feasible in 40 % of cases only. Biliary resection accompanied by major hepatectomy is considered the only curative modality to the date, but its results aren't satisfactory as well as the majority of patients aren't seemed the surgical candidates. Thus the locoregional technologies, i.e. radiation therapy, radiofrequency ablation and photodynamic therapy (PDT), are widely spread. PDT should be preferred over other local modalities due to safety, efficiency, possibility of reinterventions, technical and economic accessibility. **Conclusion.** Modern approaches to the management of Klatskin tumor do not differ much from the those proposed by the first researchers in the middle of the XXth century and comes down to the biliary stricture dilatation and the sustenance of the normal bile passage as long as possible. However, despite the strategic stagnation, significant tactical successes were achieved thus allowing significant prolongation of survival in previously considered incurable patients.

Key words: Klatskin tumor, hilar cholangiocarcinoma, locoregional technology, biliary strictures, biliary decompression, antitumor treatment, life expectancy, epidemiology, extrahepatic bile ducts, tumor growth, percutaneous transhepatic cholangiostomy, transpapillary decompression.

1. Гиллюсная холангиокарцинома. Общие сведения об опухоли

1.1. Истоки исследования. Первое упоминание в литературе о «склерозирующей и медленно растущей аденокарциноме долевых внутрипеченочных желчных протоков», вызывающей механическую желтуху, принадлежит W. Altemeier et al. (1957) [1]. В 1965 г. американский исследователь G. Klatskin подробно описал серию из 13 клинических наблюдений «необычной, относительно небольшой и медленно растущей опухоли, имеющей тенденцию оставаться резко локализованной и сопровождаться билиарной обструкцией, печеночной недостаточностью и инфекционными осложнениями» [2]. С этого момента заболевание было выделено в отдельную нозологическую единицу и стало известно под именем своего исследователя – опухоль Клацкина (ОК). Под таким названием оно обозначено в разделе морфологии МКБ-10 (код M8162/3), а вот в разделе новообразований оно может учитываться в двух группах – «опухоль внепеченочных желчных протоков» (код C24.0) и «рак печени и внутрипеченочных желчных протоков» (код C22). Кроме того, в научных публикациях используется множество синонимов заболевания: рак проксимальных внепеченочных желчных протоков, холангиокарцинома конfluence желчевыводящих путей, гиллюсная холангиокарцинома, перихиллярная холангиокарцинома, воротная холангиокарцинома и др.

1.2. Эпидемиология. Отдельного статистического учета заболеваемости опухолью Клацкина в России, как и в большинстве стран мира, не существует. В официальном статистическом сборнике «Злокачественные новообразования в России в

2016 г.» больные гиллюсной холангиокарциномой учитываются в группах «рак печени и внутрипеченочных желчных протоков» (код C22) и «рак желчного пузыря и внепеченочных желчных протоков» (код C23, C24), абсолютное число заболевших составило в 2016 г. 8 320 и 3 654, а прирост заболеваемости за 10 лет – 26,64 % и 11,84 % соответственно [3]. Сложно точно сказать, какая доля в этих двух группах приходится на больных опухолью Клацкина, однако, по оценкам ряда авторов, рак проксимальных внепеченочных желчных протоков составляет до 70 % всего холангиоцеллюлярного рака. Заболеваемость существенно различается в зависимости от региона и варьирует от 2–6 случаев на 100 000 жителей в странах Западной Европы и Северной Америки до 113 на 100 000 населения в странах Ближнего и Среднего Востока, Северной Африки, что обусловлено пищевыми факторами и паразитарными заболеваниями [4–11]. В связи с этим первые научные работы, проведенные западными исследователями, были основаны на опыте лечения нескольких десятков больных. В начале 2000-х годов появились данные мультицентровых азиатских, прежде всего корейских, канцер-регистров, представляющие значительную ценность в силу как большого числа наблюдений (более тысячи), так и проспективного набора материала [12, 13]. Россия занимает промежуточное положение между Востоком и Западом, в крупных исследовательских центрах количество наблюдений не превышает 300 пациентов [9, 14–17].

Факторами риска опухолевой трансформации эпителиоцитов желчных протоков являются заболевания, приводящие к хроническому воспалительному процессу в их стенках. К ним относятся хронические вирусные гепатиты В/С, фиброз и

цирроз печени, гепатикохоледохолитиаз, хронический холецистит, неалкогольный стеатогепатит, паразитарные инвазии, вызываемые плоскими червями класса трематод *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis*. Чаще всего холангиоцеллюлярный рак печени ассоциируется с первичным склерозирующим холангитом (ПСХ) и воспалительными заболеваниями кишечника. Холангиокарцинома развивается у 5–15 % пациентов с ПСХ, при этом заболеваемость в течение года составляет 0,6–1,5 % [6]. Также к факторам риска относят возраст старше 60 лет, мужской пол, хронический панкреатит, кисты желчных протоков, метаболический синдром [5–7, 11, 18–20].

1.3. Особенности роста и структуры опухоли. Общепринятая «локализационная» классификация холангиокарцином с делением на опухоли внутрипеченочных, проксимальных и дистальных внепеченочных желчных протоков сложилась исторически ввиду того, что у истоков изучения данной нозологии стояли хирурги. Опухоль Клацкина рассматривались как карцинома эпителия проксимальных внепеченочных желчных протоков, развивающаяся в формальных границах от места впадения пузырного протока в гепатикохоледох до секторальных желчных протоков. Это создавало удобства для выбора оперативного пособия, но мало отражало особенности биологического поведения опухоли. В дальнейшем стало очевидно, что течение заболевания определяется не столько локализацией, сколько типом роста опухоли, частота встречаемости которого варьирует в разных отделах билиарного тракта [12, 21, 22]. Для ОК, как и других холангиокарцином, выделяют несколько макроскопических форм роста: масс-образующий (mass-forming), перидуктально-инфильтративный (periductal-infiltrating) и внутрипротоковый (intraductal), – существенно различающихся по прогнозу продолжительности жизни [21, 22]. Подавляющее большинство карцином проксимальных внепеченочных желчных протоков относятся к перидуктально-инфильтративному типу, который в данном обзоре в дальнейшем будет рассматриваться в качестве базисного варианта [23]. Гиллюзные холангиокарциномы чаще представлены высокодифференцированными аденокарциномами ацинарного, тубулярного, трабекулярного или папиллярного типа [14, 18, 24, 25]. Их особенностью является выраженная десмопластическая опухолевая строма, которая содержит большое количество опухоли-ассоциированных фибробластов, а также воспалительных клеток, в частности опухоль-ассоциированных макрофагов [1, 14, 26]. Второй отличительной чертой этой опухоли является инфильтративный характер роста и отсутствие четкой демаркации от окружающих тканей, в связи с чем в клинической практике билиарная стриктура длительное время принималась за зону неопластического поражения. Интерес к опреде-

лению циркулярных и лонгитудинальных границ опухоли возник позже и был обусловлен неудовлетворительными результатами изолированных резекций желчных протоков, выполнявшихся на начальных этапах становления билиарной онкохирургии. В 80-е годы XX века в попытках радикального удаления ОК протоковые резекции стали дополняться гемигепатэктомиями. Последующее морфологическое исследование удаленных препаратов легло в основу изучения особенностей локорегионарного распространения опухоли и ее взаимоотношений с окружающими тканями. Н. Shimada et al., исследовав протяженность опухолевой инфильтрации вдоль стенки желчных протоков на 29 препаратах, показали, что только в 1 наблюдении опухоль распространялась исключительно по слизистой оболочке, в 3 – по слизистой оболочке и трансмурально, а в подавляющем большинстве случаев (n=25) распространение опухоли происходило трансмурально без вовлечения слизистой оболочки. Еще более любопытными были данные о лонгитудинальных границах: в проксимальном направлении микроскопически определяемая неопластическая инфильтрация распространялась от края билиарной стриктуры вдоль стенки желчного протока в среднем на 16,8 мм (10–85 мм), причем это расстояние во многом зависело от гистотипа ОК и при наиболее распространенной тубулярной аденокарциноме в среднем составляло 22,6 мм [27]. Хотя эти данные относились к удаленным препаратам, логично предположить, что сходные закономерности наблюдаются и в остающейся части печени и желчных протоках. Перидуктально-инфильтративный рост опухоли в большинстве случаев выражается в инвазии прилежащих трубчатых структур. По данным Natsume et al., исследовавших морфологический материал после 201 резекции, инвазия лимфатических сосудов встречается в 79,4 %, периневральная инвазия – в 90 %, венозная инвазия – в 50,2 %, инвазия в паренхиму – в 76,9 % случаев [28]. Наличие любого из перечисленных типов инвазии достоверно ухудшает прогноз заболевания [28, 29].

1.4. Естественное течение заболевания. Описательная картина развития заболевания без специального лечения, то, что в англоязычной литературе определяется понятием «natural history», является базисом, от которого отталкивается исследователь в оценке методик лечения. Общепринятого терминологического аналога «natural history» в отечественной научной литературе не существует, в связи с чем в дальнейшем будет использоваться дословный перевод – «естественное течение». Несмотря на очевидную важность, тема естественного течения гиллюзной холангиокарциномы изучена недостаточно; информация, которую удалось найти, представляется скудной и фрагментарной.

Ранние клинические стадии (преджелтушный период) ОК характеризуются неспецифическими проявлениями, а заболевание в это время диагностируется крайне редко [30, 31]. У многих пациентов в разные сроки до развития механической желтухи отмечаются кожные проявления (зуд, сыпи), а также малые признаки синдрома портальной гипертензии (воспалительные заболевания слизистой двенадцатиперстной кишки и желудка, геморрой), на основании которых сложно заподозрить гилусную холангиокарциному. Наиболее часто заболевание распознается когда появляется безболевого механическая желтуха, ахоличный стул и темная моча [2, 14, 24, 25, 32, 33]. Также на данной стадии заболевания могут отмечаться кожный зуд – в 87 %, холангит – в 52,4 % (в том числе с образованием холангиогенных абсцессов печени – в 20 %), потеря массы тела – в 20 %, боли в эпигастрии и правой подреберной области – в 15,6 % [14]. В отдельную группу следует отнести больных, страдающих ПСХ, у которых клиническое течение и прогноз гилусной холангиокарциномы существенно отличаются от общей популяции, а продолжительность жизни определяется скорее вторичным билиарным циррозом печени и его осложнениями, чем опухолевым процессом [34].

Для опухоли Клацкина характерен медленный рост и относительно позднее отдаленное метастазирование [2, 35]. Тем не менее она относится к числу наиболее тяжело протекающих новообразований гепатопанкреатобилиодуоденальной области. Локализация ОК в стратегически важной анатомической зоне – конfluence печеночных протоков – приводит к быстрому развитию катастрофических осложнений: механической желтухе, острому холангиту, холангиогенным абсцессам печени, сепсису, портальной гипертензии, варикозному расширению вен пищевода, язвенным поражениям верхних отделов желудочно-кишечного тракта с высоким риском фатальных кровотечений. Также необходимо учитывать выраженное катаболизующее действие холангиокарцином, следствием которого является тяжелая эндогенная интоксикация и кахексия.

Сведения о продолжительности жизни при естественном течении ОК представлены в немногочисленных работах азиатских авторов. По данным J. Park et al., медиана выживаемости больных гилусной холангиокарциномой без противоопухолевого лечения, даже при дренировании желчных протоков, составляет 5,9 мес [12]. Необходимо отметить, что в силу выполненного билиарного дренирования, со строго научной позиции эти данные не вполне укладываются в определение естественного течения. Однако сравнительных данных по продолжительности жизни больных опухолью Клацкина, которым не проводилась билиарная декомпрессия, в литературе нами не найдено. В свою очередь J.H. Ji et al. в мультицентровом южнокорейском исследовании на смешанной группе

больных с различными билиарными злокачественными опухолями не нашли достоверной разницы в медиане выживаемости пациентов, которым проводилось или не проводилось дренирование желчных протоков – 8,3 против 6,2 мес соответственно ($p=0,357$), если в дальнейшем они не получали противоопухолевого лечения [13].

Таким образом, гилусная холангиокарцинома является редкой и недостаточно изученной опухолью, характеризующейся местным инфильтративным ростом и поздним отдаленным метастазированием. Заболевание чаще всего диагностируется на стадии тяжелых осложнений и имеет плохой прогноз продолжительности жизни.

2. Современные подходы к лечению. Результаты

Методы лечения гилусной холангиокарциномы можно разделить на два больших раздела – билиарную декомпрессию и собственно противоопухолевое лечение.

2.1. Билиарная декомпрессия. Основным принцип лечения гилусной холангиокарциномы был заложен еще Дж. Клацкином, написавшим в своей классической статье, что, «поскольку смерть пациента редко связана с массивной опухолевой инвазией печени или экстрапеченочным распространением, паллиативные хирургические вмешательства, направленные на разрешение билиарной обструкции, эффективны в разрешении симптомов и продлении жизни» [2]. Лечение опухоли Клацкина начинается с билиарной декомпрессии, задачей которой является обеспечение желчеотведения от печени посредством восстановления естественного либо создания альтернативного пути оттока с целью купирования явлений механической желтухи и гнойного холангита.

2.1.1. Хирургические методы дренирования желчных протоков. Изначально дренирование желчных протоков при проксимальных стриктурах выполнялось посредством открытых хирургических вмешательств, которые включали в себя реканализацию опухоли и транспеченочное дренирование или паллиативную резекцию желчных протоков с формированием анастомозов на транспеченочных дренажах. Доля осложнений и летальность при этих операциях достигали до 45 и 11 % соответственно [36, 37]. В настоящий момент такие вмешательства имеют скорее историческое значение и выполняются только в тех случаях, когда малоинвазивные вмешательства недоступны либо технически неуспешны.

2.1.2. Чрескожная чреспеченочная холангиостомия (ЧЧХС). ЧЧХС (антеградная холангиостомия) – метод билиарной декомпрессии путем создания альтернативного желчеоттока через пластиковый катетер, установленный во внутрпеченочные желчные протоки через переднюю брюшную

стенку или межреберье и паренхиму печени под контролем методов визуализации. Ее предтечей была методика чрескожной пункции желчного пузыря с последующей холангиографией, описанная Н. Burckhardt и N. Muller в 1921 г. [38]. На 60–80-е гг. XX века пришлось активное развитие ЧЧХС по двум направлениям – стилет-катетерного дренирования и дренирования по Seldinger с использованием гибкой пункционной иглы ЧНВА, причем последний способ стал общепринятым в настоящее время [39, 40]. Интервенционное дренирование на этапе становления метода было сопряжено с высокой послеоперационной летальностью (до 33 %) и частотой осложнений (до 74 %), сравнимыми и даже превышающими таковые для открытых вмешательств. Наиболее тяжелыми осложнениями являются кровотечения в протоки и брюшную полость, желчеистечения, сепсис [41–43]. По мере накопления опыта с начала 1990-х гг. стала отмечаться тенденция к уменьшению послеоперационной летальности до приемлемых 4,3–8,9 % к 2010-м [40, 44]. ЧЧХС, помимо рисков интервенционного вмешательства, также предполагает оставление в просвете желчных протоков хронического инородного тела (постоянного наружного или наружно-внутреннего дренажа), что сопровождается риском его частичной или полной миграции, обтурации, инфицирования, развития хронического рецидивирующего холангита и сепсиса, с которыми сталкиваются многие пациенты в средне- и долгосрочной перспективе [45]. Реверсивный (наружный или наружно-внутренний) режим функционирования низведенного за зону опухолевой стриктуры холангиостомического дренажа позволяет обеспечить не только возврат желчи в двенадцатиперстную кишку, но и управление гидродинамическим давлением в желчных протоках, что имеет решающее значение при обострениях холангита.

2.1.3. Транспапиллярная декомпрессия. Примерно в те же годы, что и ЧЧХС, во второй половине XX века, развивалась методика ретроградного дренирования желчных протоков, направленная на восстановление естественного пути желчеоттока путем транспапиллярной установки назобилиарных катетеров или каркасных конструкций (стентов) через область стриктуры в двенадцатиперстную кишку. Первое описание эндоскопической ретроградной холангиопанкреатографии сделано в 1969 г., а успешное эндопротезирование общего желчного протока – в 1980 г. [46, 47]. Мощным толчком к развитию ретроградного билиарного дренирования послужили модификация конструкции дуоденоскопа с увеличением диаметра рабочего канала и создание специальных стентов [48, 49]. С 1981 г. начато дренирование не только дистальных, но и проксимальных стриктур, вызванных злокачественным поражением ворот

печени [50]. Спектр тяжелых осложнений при ретроградном дренировании несколько отличается от таковых при антеградном – острый панкреатит, перфорация, кровотечения, сепсис; однако они также сопровождаются достаточно высокой летальностью – до 10 % [51]. Необходимо отметить, что ретроградное эндопротезирование проксимальных билиарных стриктур при ОК технически успешно лишь в 30–40 % [52, 53].

2.1.4. Билиарное стентирование. Эндобилиарное протезирование представляет собой антеградную или ретроградную установку в область стриктуры желчных протоков специальных каркасных конструкций (стентов) для расширения просвета и восстановления проходимости. Существует множество модификаций стентов, среди которых можно выделить две принципиальные разновидности: пластиковые и металлические саморасширяющиеся [51]. Первые могут устанавливаться временно или постоянно, а последние являются окончательным способом восстановления желчеоттока. Протезирование металлическими стентами изначально представлялось надежным методом разрешения механической желтухи, на который возлагались большие надежды, поскольку он избавлял пациента от физических и психологических страданий, связанных с наружными дренажами. Однако энтузиазм исследователей быстро сменился разочарованием. Дело в том, что установленный в желчные протоки стент становится матрицей для оседания солей желчных кислот и бактериальных пленок, а также способствует разрастанию грануляционной ткани вследствие активного хронического воспаления. В результате эндопротез обтурируется и становится источником гнойного рецидивирующего холангита, а затем бактеремии и сепсиса. Медиана проходимости билиарных стентов, независимо от способа установки, составляет 6–8 мес при высоких билиарных стриктурах [51, 54–56], а удаление саморасширяющегося стента практически невозможно [57]. Это обстоятельство скомпрометировало использование металлических эндопротезов у больных с доброкачественными билиарными стриктурами и большой ожидаемой продолжительностью жизни. У пациентов, страдающих раком проксимальных внепеченочных желчных протоков, медиана выживаемости без специфического противоопухолевого лечения составляет 5–6 мес, и прежде стентирование желчных протоков могло, хотя и с оговорками, рассматриваться в качестве средства паллиативной помощи, поскольку с проблемами обтурации сталкивались лишь единичные «долгжители». В настоящее время медиана выживаемости неоперабельных больных ОК, получающих локорегионарное лечение, превышает медиану проходимости стентов в несколько раз, в связи с чем проблема обтурации стентов может встать практически перед каждым пациентом [17, 58, 59]. Рестентирование нельзя рассматривать в качестве

адекватного способа разрешения проблемы, ведь источник – инфицированное инородное тело – не удаляется.

Вопрос выбора метода желчеотведения у больных опухолью Клацкина остается дискуссионным. Ретроградное дренирование при проксимальных стриктурах, как было отмечено, технически осуществимо менее чем в половине случаев, поэтому в качестве хорошо воспроизводимого метода билиарной декомпрессии у этой категории больных можно рассматривать лишь ЧЧХС [52, 53]. Помимо технического успеха и непосредственных осложнений антеградных или ретроградных вмешательств, необходимо также принимать во внимание, что при любом способе дренирования в билиарном тракте остается инородное тело, обрекающее пациента на хронический рецидивирующий холангит. Хотя наружная холангистомия значительно ухудшает качество жизни больных, ее преимущества – управление внутрипротоковым давлением и простота билиарной санации – часто являются решающими в выборе способа декомпрессии.

2.2. Специфическое лечение

2.2.1. Хирургическое лечение. Опухоль Клацкина – относительно небольшое, ограниченное образование с поздним отдаленным метастазированием, приводящее к смерти больного в первую очередь из-за локальных осложнений, и на первый взгляд кажется идеально подходящей для хирургического лечения при условии его радикальности. Эволюцию хирургических методов на протяжении последних 50 лет можно охарактеризовать как погоню за тотальным удалением опухоли: паллиативные дренирующие вмешательства сменились попытками радикальных резекций внепеченочных желчных протоков, которые впоследствии стали дополняться обширными резекциями печени, магистральных сосудов с различными видами протезирования и, наконец, трансплантацией печени [14, 60]. Однако расширение объемов операций, сопровождающееся ростом числа осложнений, которые даже в специализированных центрах могут превышать 50 %, значимо не увеличило число резектабельных больных и дало более чем скромные отдаленные результаты [14, 16, 60]. По данным ряда исследователей, резектабельность при ОК составляет 30–50 %, частота рецидивов даже при условии R0-резекции достигает 76 % в течение 7 лет, а 5-летняя выживаемость после хирургического лечения, по самым оптимистичным представлениям, варьирует от 10 до 40 % [11, 61–63]. Высокая доля нерадикальных операций и как следствие локальных рецидивов обусловлена, в первую очередь, отсутствием адекватной предоперационной оценки проксимальной границы опухоли. Общепринятая классификация Bismuth-Corlette, основанная на систематизации проекционных рентгеновских изображений внутренних контуров желчных протоков, не дает полного представления о распространении процесса ввиду

протяженного, преимущественно проксимального перидуктального роста опухоли при макроскопически не измененной стенке желчных протоков [27]. При сравнении типа поражения по Bismuth-Corlette, установленного на основании МРТ, КТ и чрескожной чреспеченочной холангиографии, с таковым по данным операционных находок точность предоперационной диагностики составила 48 %. Проведенный метаанализ, в который были включены 540 пациентов, не показал клинической значимости данной классификации [64].

Таким образом, необходимо признать, что хирургические методики на современном этапе показаны лишь узкой группе пациентов, а их результаты дают хоть и лучшие из существующих, однако неудовлетворительные результаты, и большинство из оперированных больных в ближайшей перспективе вынуждены повторно обращаться за помощью.

Европейская ассоциация по изучению печени (EASL) не дает четких рекомендаций по выполнению трансплантации печени при холангиоцеллюлярном раке [65]. Согласно литературным данным, опубликованным в начале 2000-х гг., частота рецидивов при таких операциях достигает 80 %, 5-летняя выживаемость не превышает 23 % [66, 67]. Отдаленные результаты такого лечения в России также признаны неудовлетворительными, поэтому, согласно национальным клиническим рекомендациям «Российского трансплантологического общества» (2013), это заболевание является противопоказанием к трансплантации печени [68]. С 2004 г. стали публиковаться результаты лечения гилосной холангиокарциномы по «протоколу Мейо», включающему химиолучевое лечение с последующей трансплантацией печени, что, по данным авторов, позволило снизить частоту рецидивов после трансплантации печени до 17–20 % и добиться 5-летней выживаемости на уровне выдающихся 54–76 % [69–72]. Однако при более подробном рассмотрении этих работ оказывается, что среди перенесших трансплантацию печени необычайно велика доля пациентов (до 61–65 %), страдающих опухолью Клацкина на фоне ПСХ. Интересным и неоднозначным представляется также факт, что диагноз опухоли не был подтвержден морфологически у всех пациентов до начала лечения. Диагностическими критериями ОК, помимо cito- и гистологического исследования, считались наличие очагового образования в воротах печени по данным методов визуализации, а также билиарной стриктуры и повышенного опухолевого маркера СА 19–9 более 100 ЕД/мл в отсутствие клинически выраженного бактериального холангита. Точное число пациентов без морфологической верификации диагноза не указано [72]. Среди факторов плохого прогноза (рецидива заболевания после трансплантации) авторы указывают перинеуральную инвазию опухоли [69], которая, как уже отмечалось ранее, является характерным

признаком «классической» опухоли Клацкина (встречается в 90 %). Поэтому объективно судить о результатах трансплантации печени у пациентов, страдающих опухолью Клацкина без ПСХ, затруднительно, требуется дальнейшее изучение этого вопроса. Возможно, трансплантация печени может иметь преимущества у пациентов, прогноз жизни которых определяется не столько опухолевой прогрессией, сколько билиарным циррозом.

2.2.2. Лекарственное лечение. В доступной литературе, посвященной лекарственному лечению опухолей гепатопанкреатодуоденальной зоны (ГПДЗ), больные гиллюсной холангиокарциномой не выделяются в отдельную группу [13, 73, 74]. Опухоли ГПДЗ крайне разнородны; среди них можно выделить новообразования плохого (внутрипеченочный холангиоцеллюлярный рак, рак желчного пузыря, рак поджелудочной железы), умеренного (гиллюсная холангиокарцинома) и относительного благоприятного (рак фатерова сосочка) прогноза, причем продолжительность жизни при естественном течении между крайними прогностическими формами может различаться в 2,5 раза – от 4,4 до 11,2 мес [13]. Тем не менее стандартной химиотерапией I линии в большинстве стран при любой форме неоперабельного (местнораспространенного или метастатического) холангиоцеллюлярного рака является комбинация гемцитабина с производными платины, которая считается эффективнее других режимов в отношении противоопухолевой активности, контроля роста опухоли и позволяет достичь медианы общей выживаемости 8–10 мес в объединенных группах [18, 75]. При этом не принимается во внимание, что медиана выживаемости в этих группах в отсутствие высокоэффективных препаратов в настоящее время в значительной степени отражает не столько результаты лекарственного лечения, сколько соотношение в них пациентов с «благоприятными» и «неблагоприятными» формами опухолей ГПДЗ. Таким образом, неадаптированный перенос результатов лекарственного лечения в этих группах на опухоли Клацкина представляется не вполне корректным.

Противопоказаниями к системному лечению являются объективный статус пациента ECOG > 1, превышение уровня гипербилирубинемии свыше двух норм, а также уровня трансаминаз более чем в 5–8 раз. Признаки нарушения белково-синтетической функции печени и обострения хронического холангита являются относительными противопоказаниями к проведению химиотерапии [18, 75]. Имеются данные, что наличие или отсутствие билиарных дренажей (стентов) не влияет на выживаемость пациентов, получающих химиотерапию [76].

2.2.3. Локальные методы лечения. Разработка локальных методов лечения также является следствием развития представлений об опухоли Клацкина как о местном процессе, развивающемся

в стратегически важной анатомической зоне – конfluence желчных протоков. Предполагалось, что реканализация желчных протоков путем некротизации внутрипросветного компонента опухоли посредством технологий, базирующихся на различных физических принципах, будет способствовать улучшению качества и увеличению продолжительности жизни этой категории больных. Наиболее известными из локальных методов являются лучевая терапия (дистанционная и/или брахитерапия), фотодинамическая терапия и радиочастотная абляция.

2.2.3.1. Лучевая терапия. Первые сообщения об успешном применении лучевой терапии при гиллюсной холангиокарциноме относятся к концу 80-х – началу 90-х гг. XX века [77–79]. Эта методика представлена наиболее распространенной в данное время дистанционной лучевой терапией (ДЛТ) и менее известной эндобилиарной лучевой терапией (интралюминальная, контактная лучевая терапия, брахитерапия), предполагающей позиционирование источников излучения (как правило, ^{192}Ir) в просвет желчного протока через наружный холангиостомический или назобилиарный дренаж, что позволяет достичь большой локальной дозы [80].

Необходимо отметить, что в опубликованных работах нам не удалось обнаружить четких рекомендаций по выбору вида лучевой терапии: выполнение ДЛТ, брахитерапии или их сочетания, по всей вероятности, определяется наличием оборудования и профессиональным опытом лучевого терапевта. Дозы и режимы облучения варьируют в значительных пределах: СОД от 28 до 70 Гр и количество фракций от 3 до 46 [17, 80–82]. Данные об уровне осложнений также широко разнятся – от 12 до 88 % [82, 83].

Среди осложнений лучевой терапии описаны тошнота, рвота, болевой синдром, лихорадка, диарея, потеря веса, желтуха, холангит, асцит/обструкция вен портальной системы, кровотечения из верхних отделов желудочно-кишечного тракта, стеноз двенадцатиперстной кишки или отключенной по Ру петли тощей кишки [17, 80–87]. Формирование билиарной стриктуры рассматривается не как осложнение, а как закономерный результат радиотерапии [87]. Постлучевой фиброз не является значимой проблемой у неоперабельных пациентов, поскольку у них невозможно избежать протезирования желчных протоков посредством стентов или наружных дренажей в отдаленном периоде. Однако у пациентов после R1/R2 резекций лучевая терапия может носить радикальный характер, поэтому развитие рубцовой билиарной стриктуры является инвалидизирующей ситуацией, которая даже в отсутствие опухоли потребует установки в желчные протоки постоянных инородных тел, провоцирующих хронический рецидивирующий холангит.

Интересной представляется работа M.F. Gerhards et. al [83], где более подробно освещаются

результаты адъювантной лучевой терапии (ДЛТ, брахитерапии и сочетанной лучевой терапии) опухоли Клацкина. Показано, что медиана выживаемости пациентов, получавших послеоперационное лучевое лечение, была в 3 раза выше, чем у больных без адъювантной терапии (24 против 8 мес), однако способ облучения (ДЛТ или ДЛТ + внутривнутрипротоковая брахитерапия) на продолжительность жизни не влиял. При этом в группе ДЛТ + внутривнутрипротоковая брахитерапия в сравнении с ДЛТ отмечался существенно больший уровень осложнений: холангит встречался в 63 % против 32 %, асцит/обструкция вен портальной системы – в 32 % против 18 %, кровотечения из верхних отделов ЖКТ – в 22 % против 14 %.

В ряде исследований было показано, что применение ДЛТ без комбинирования с другими методами лечения приводило к увеличению общей выживаемости больных холангиокарциномой [80, 81, 84, 85]. Однако эти данные были подвергнуты сомнению в недавнем исследовании E.L. Pollom et al., которые на большой выборке (2343 пациента) с использованием метода псевдорандомизации, устраняющего влияние вмешивающихся факторов (кофакторов), показали отсутствие достоверной разницы в выживаемости у больных, получавших или не получавших лучевую терапию (9,3 против 10 мес). При этом авторы отмечают, что в группе больных, получавших химиотерапию, комбинация с лучевой терапией приводила к достоверному увеличению продолжительности жизни (скорректированное отношение рисков 0,82 (95 % 0,70–0,97, $p=0,02$)) [88].

В России применение эндобилиарной лучевой терапии у больных гиллюсной холангиокарциномой ограничено одним медицинским учреждением – НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [17, 87]. Е.С. Макаров и соавт. показали, что применение внутривнутрипросветной лучевой терапии (иногда в сочетании с ДЛТ) приводит к статистически значимому увеличению продолжительности жизни по сравнению с паллиативным дренированием желчных протоков: выживаемость в основной группе составила 100, 91,4, 72,8, 47,2 и 36,3 % в течение 3, 6, 9, 12 и 24 мес соответственно, против 94,5, 56,4, 47,3, 7,3 и 0 % в группе контроля за тот же период наблюдений [17].

В отношении брахитерапии в одном из последних метаанализов (12 оригинальных исследований, 641 пациент) также показано, что у больных, перенесших паллиативное стентирование желчных протоков в сочетании с внутривнутрипросветной лучевой терапией, увеличиваются время до обтурации стента (OR 0,19; 95 % CI 0,13–0,28; $p<0,00001$) и общая выживаемость (MD=3,15; 95 % CI 2,64–3,66; $p<0,00001$) по сравнению с больными, которым выполняется только стентирование [86]. В то же время Y. Yoshioka et al. в своем исследовании приходят к выводу, что дополнение ДЛТ внутривнутрипросветной лучевой терапией не увеличивает об-

щую выживаемость пациентов, хотя и позволяет достичь лучшего локального контроля [89].

Химиолучевое лечение в неоадъювантном режиме перед трансплантацией печени было описано в разделе «Хирургическое лечение».

Резюмируя, необходимо отметить, что, несмотря на почти тридцатилетнюю историю применения различных вариантов лучевой терапии при гиллюсной холангиокарциноме, опубликованные работы до сих пор противоречивы, почти всегда ретроспективны; отсутствует стандартизация доз и режимов облучения, резко разнятся данные по числу осложнений и их влиянию на продолжительность жизни, не разработаны вопросы сочетания с другими лечебными воздействиями.

2.2.3.2. Радиочастотная абляция. Радиочастотная абляция (РЧА) – метод, основанный на свойстве переменного тока частотой 350–500 кГц распространяться в окружающие ткани, вызывая колебательные движения ионов, приводящие к нагреванию тканей, коагуляции белков с формированием зоны некроза [90, 91]. В лечении злокачественных опухолей печени метод применяется с 1990-х гг. [92–94]. Активное изучение этого метода в новом для себя ключе – эндобилиарной РЧА, – началось относительно недавно: в 2011–13 гг. разработан биполярный катетер Habib EndoHPB (EMcision Ltd., London, UK) диаметром 8 Fr (2,6 мм), который устанавливается в желчные протоки посредством 0,035-дюймового проводника [95, 96]. Поперечный диаметр зоны деструкции тканей может варьировать от 2,1 до 11,3 мм (в эксперименте *ex vivo*) в зависимости от мощности и продолжительности воздействия [97, 98].

Как и другие локорегионарные технологии, эндобилиарная РЧА направлена на местную деструкцию опухоли путем сплошного нагревания тканей и достижения коагуляционного некроза опухоли. Однако в условиях сложных топографо-анатомических взаимоотношений ОК и сосудистых элементов области ворот печени и печеночно-двенадцатиперстной связки отсутствие селективности термического воздействия может представлять существенную проблему. Среди осложнений радиочастотного воздействия на желчные протоки отмечаются болевой синдром, холангит, холангиосепсис, эмпиема желчного пузыря, гемобилия, тромбоз вен портальной системы, печеночная кома, инфаркт сегмента печени, вызванный термическим повреждением сегментарной печеночной артерии, формирование псевдоаневризмы печеночной артерии, рубцовая стриктура желчных протоков с развитием желтухи [59, 97, 99–101]. Кроме того, желчные протоки проходят по передней поверхности воротной вены, однако ни в одной из опубликованных статей не уделяется внимание хорошо известному эффекту охлаждения, описанному для РЧА очаговых образований печени и состоящему в резком уменьшении эффективности

гипертермического воздействия при прилежании опухоли к крупному сосуду [102, 103].

Литературные данные по отдаленным результатам РЧА гилусной холангиокарциномы, в силу относительной новизны технологии, немногочисленны, медиана выживаемости составляет 6,1–10,1 мес [59, 104]. Возможным преимуществом этой технологии может стать относительная доступность в техническом и финансовом плане, а также отсутствие необходимости использования медикаментозных препаратов, требующих дорогостоящих клинических испытаний и регистрации. Безусловно, требуется дальнейшее изучение метода эндобилиарной РЧА и определение его роли в лечении рака проксимальных внепеченочных желчных протоков.

2.2.3.3. Фотодинамическая терапия (ФДТ). ФДТ – это бинарный метод фотохимиотерапии, включающий в себя относительно селективное накопление патологической ткани (опухолью с зоной перифокального воспаления) химического агента, называемого фотосенсибилизатором, с последующей его активацией при помощи света, что запускает каскад внутриклеточных реакций, называемых фотодинамическим эффектом, приводящих к гибели опухолевых клеток. Фотодинамический эффект был открыт в 1900 г. О. Раабом, аспирантом известного биолога Г. фон Таппейнера. Было установлено, что флюоресцентные красители акридин и его производные в малых концентрациях под влиянием света оказывают сильное повреждающее действие на микроорганизмы. В 1902 г. Леду-Лебартс показал, что кроме красителя и света для фотодинамического повреждения обязательным компонентом является кислород. В 1911 г. В. Хаусманн продемонстрировал высокую фототоксичность гематопорфирина, в 1924 г. А. Поликар обнаружил избирательное накопление его опухолями, что стало началом изучения ФДТ в онкологии [105]. Первое сообщение об успешной внутрипротоковой ФДТ при внепеченочной холангиокарциноме появилось в 1991 г. [106]. В начале 2000-х гг. проведены проспективные рандомизированные исследования, которые показали достоверное кратное увеличение выживаемости больных, которым выполнялась билиарная декомпрессия + ФДТ, в сравнении с пациентами, подвергшимися

эндоскопической или интервенционной билиарной декомпрессии [107, 108]. Эти исследования можно считать пусковым моментом внедрения эндобилиарной ФДТ в клиническую практику.

Среди ранних послеоперационных осложнений применения ФДТ выделяют холангит (до 36,5 %) и фототоксическую реакцию (до 11,1 %). Более редкие осложнения эндобилиарной ФДТ: холецистит (~2 %), панкреатит (~1,3 %), абсцессы печени (~3,4 %), кровотечения (~2,7 %), перфорация (~0,7 %), сепсис (~5,4 %), желчеистечение (~0,7 %). Среди пациентов с осложнениями смертность, согласно литературным данным, составляет до 8,18 %, основной причиной является холангиогенный сепсис. Большинство исследователей сообщают о существенном увеличении продолжительности жизни пациентов, которым выполнялась эндобилиарная ФДТ [56, 107–117]. Разница в продолжительности жизни пациентов составила от 1,5 до 5 раз (таблица) [56, 107, 108, 112, 114]. В одном из исследований ФДТ настолько улучшила результаты лечения, что набор в контрольную группу (без ФДТ) был остановлен по этическим соображениям [107].

Избирательное действие и возможность многократного повторения процедуры делают ФДТ наиболее ценным из существующих внутрипротоковых методов противоопухолевого воздействия. Наличие отечественных лазерных аппаратов и инструментария для доставки света в желчные протоки с возможностью своевременного внесения конструктивных изменений, а также зарегистрированных для клинического применения в России фотосенсибилизаторов делают ФДТ доступной для большинства клиник, владеющих методами эндобилиарных вмешательств [15].

Заключение

Несмотря на более чем шестидесятилетний опыт изучения гилусной холангиокарциномы, кардинального сдвига в понимании ее этиологии и патогенеза не произошло. Лечение этого недуга в настоящее время, по сути, мало чем отличается от предложенного первыми исследователями и сводится к ликвидации билиарной стриктуры и поддержанию свободного желчеоттока в течение максимально возможного времени. При этом нельзя

Таблица

Отдаленные результаты эндобилиарной ФДТ гилусной холангиокарциномы (литературные данные)

Исследование	Медиана выживаемости в группе билиарной декомпрессии + ФДТ	Медиана выживаемости в группе билиарной декомпрессии
Ortner M.E. et al., 2003 [107]	493 дней (n=20)	98 дней (n=19)
Cheon Y.K. et al., 2004 [112]	558 дней (n=27)	288 дней (20)
Zoepef T. et al., 2005 [108]	21 мес (n=16)	7 мес (n=16)
Witzigmann H. et al., 2006 [114]	12 мес (n=68)	6,4 мес (n=56)
Lee T.Y. et al., 2012 [56]	356 ± 213 дней (n=18)	230 ± 73 дней (n=15)

Примечание: n – количество пациентов.

не отметить, что, несмотря на стратегическую стагнацию, за эти годы были достигнуты значительные тактические успехи. Технологический прогресс позволил перевести билиарную декомпрессию из разряда «героической хирургии» в рутинные, относительно безопасные вмешательства с воспроизводимым результатом. Развитие хирургических и локорегионарных методик, лекарственной терапии привело к кратному увеличению выживаемости в

группе больных, которым до этого сложно было предложить сколько-нибудь значимую помощь. Однако результаты лечения опухоли Клацкина нельзя назвать удовлетворительными – ведь через 5 лет от момента установления диагноза в живых остается менее 10 % пациентов [118], что означает наличие больших «белых пятен» в понимании этой нозологии и открывает огромные перспективы для новых исследований.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Altemeier W.A., Gall E.A., Zininger M.M., Hoxworth P.I. Sclerosing carcinoma of the major intrahepatic bile ducts. Arch. Surg. 1957; 75: 450.
2. Klatskin G. Adenocarcinoma of the hepatic ducts at its bifurcation within the porta hepatis. Am J Med. 1965; 38: 241–56.
3. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). М., 2018. 250. [Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2016 (morbidity and mortality). Moscow, 2018. 250. (in Russian)].
4. Майстренко Н.А., Шейко С.Б., Алентьев А.В., Азимов Ф.Х. Холангиоцеллюлярный рак (особенности диагностики и лечения). Практическая онкология. 2008; 9 (4): 229–236. [Maystrenko O.N., Sheyko S.B., Alentiev A.V., Azimov F.H. Cholangiocellular cancer (features of diagnosis and treatment). Practical Oncology. 2008; 9 (4): 229–236. (in Russian)].
5. Rizvi S., Gores G.J. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. Gastroenterology. 2013 Dec; 145 (6): 1215–29. doi: 10.1053/j.gastro.2013.10.013.
6. Suarez-Munoz M.A., Fernandez-Aguilar J.L., Sanchez-Perez B., Perez-Daga J.A., Garcia-Albiach B., Pulido-Roa Y., Marin-Camero N., Santoyo-Santoyo J. Risk factors and classifications of hilar cholangiocarcinoma. World J Gastrointest Oncol. 2013 Jul 15; 5 (7): 132–8. doi: 10.4251/wjgo.v5.i7.132.
7. Tyson G.L., El-Serag H.B. Risk factors for cholangiocarcinoma. Hepatology. 2011 Jul; 54 (1): 173–84. doi: 10.1002/hep.24351.
8. Valls C., Ruiz S., Martinez L., Leiva D. Radiological diagnosis and staging of hilar cholangiocarcinoma. World J Gastrointest Oncol. 2013 Jul 15; 5 (7): 115–26. doi: 10.4251/wjgo.v5.i7.115.
9. Седов А.П., Парфенов И.П., Мишустин А.М., Карпачев А.А., Ждановский О.М., Францев С.П. Опухоль Клацкина: проблема диагностики и лечения. Анналы хирургической гепатологии. 2006; 11: 3: 11–16. [Sedov A.P., Parfenov I.P., Mishustin A.M., Karpachev A.A., Zhdanovsky O.M., Frantsev S.P. Klatskin Tumor: Diagnostic and Management Problems. Annals of Surgical Hepatology. 2006; 11: 3: 11–16. (in Russian)].
10. Deoliveira M.L., Schulick R.D., Nimura Y., Rosen C., Gores G., Neuhaus P., Clavien P.A. New staging system and a registry for perihilar cholangiocarcinoma. Hepatology. 2011 Apr; 53 (4): 1363–71. doi: 10.1002/hep.24227.
11. Soares K.C., Kamel I., Cosgrove D.P., Herman J.M., Pawlik T.M. Hilar cholangiocarcinoma: diagnosis, treatment options, and management. Hepatobiliary Surg Nutr. 2014 Feb; 3 (1): 18–34. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.02.05.
12. Park J., Kim M.H., Kim K.P., Park do H., Moon S.H., Song T.J., Eum J., Lee S.S., Seo D.W., Lee S.K. Natural History and Prognostic Factors of Advanced Cholangiocarcinoma without Surgery, Chemotherapy, or Radiotherapy: A Large-Scale Observational Study. Gut Liver. 2009; 3 (4): 298–305.
13. Ji J.H., Song H.N., Kim R.B., Oh S.Y., Lim H.Y., Park J.O., Park S.H., Kim M.J., Lee S.I., Ryou S.H., Hwang I.G., Jang J.S., Kim H.J., Choi J.Y., Kang J.H. Natural history of metastatic biliary tract cancer (BTC) patients with good performance status (PS) who were treated with only best supportive care (BSC). Jpn J Clin Oncol. 2015 Mar; 45 (3): 256–60. doi: 10.1093/jco/hy210.
14. Вишневецкий В.А., Тарасюк Т.И. Диагностика и хирургическое лечение рака проксимальных отделов внепеченочных желчных протоков (опухоль Клацкина). Практическая онкология. 2004; 5 (2): 126–134. [Vishnevsky V.A., Tarasyuk T.I. Diagnosis and surgical treatment of cancer of the proximal extrahepatic bile ducts (Klatskin tumor). Practical oncology. 2004; 5 (2): 126–134. (in Russian)].
15. Долгушин Б.И., Сергеева О.Н., Францев Д.Ю., Кукушкин А.В., Панов В.О., Вишке Э.Р., Косырев В.Ю., Черкасов В.А., Трофимов И.А., Чистякова О.В., Мороз Е.А., Погребняков И.В., Шишкина Н.А. Внутрипротоковая фотодинамическая терапия при воротной холангиокарциноме у неоперабельных больных. Анналы

- хирургической гепатологии. 2016; 21 (3): 106–118. [Dolgushin B.I., Sergeeva O.N., Frantsev D.Yu., Kukushkin A.V., Panov V.O., Virshke E.R., Kosyrev V.Yu., Cherkasov V.A., Trofimov I.A., Chistyakova O.V., Moroz E.A., Pogrebnyakov I.V., Shishkina N.A. Intraductal photodynamic therapy for portal cholangiocarcinoma in inoperable patients. Annals of surgical hepatology. 2016; 21 (3): 106–118. (in Russian)].
16. Патютко Ю.И., Поляков А.Н., Котельников А.Г., Сагайдак И.В., Гахраманов А.Д., Чистякова О.В., Мороз Е.А. Хирургическое и комбинированное лечение больных холангиоцеллюлярным раком. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2015; 11: 11–24. [Patyutko Y.I., Polyakov A.N., Kotelnikov A.G., Sagaidak I.W., Gahramanov A.D., Chistyakova O.V., Moroz E.A. Surgical and combined treatment of patients with cholangiocellular carcinoma. Pirogov Russian Journal of Surgery. 2015; 11: 11–24. (in Russian)].
17. Макаров Е.С., Нечушкин М.И., Долгушин Б.И., Кукушкин А.В., Молодикова Н.Р., Козлов О.В. Внутрипротоковая лучевая терапия неоперабельных больных холангиоцеллюлярным раком: технические аспекты и отдаленные результаты. Анналы хирургической гепатологии. 2014; 19 (4): 48–55. [Makarov E.S., Nechushkin M.I., Dolgushin B.I., Kukushkin A.V., Molodikova N.R., Kozlov O.V. Intraductal Radiotherapy in Patients with Inoperable Cholangiocarcinoma. Technical Aspects and Long-Term Outcomes. Annals of surgical hepatology. 2014; 19 (4): 48–55. (in Russian)].
18. Бредер В.В. Рак желчевыводящей системы. Практическая онкология. 2012; 13 (4): 269–275. [Bredner V.V. Cancer of the biliary system. Practical Oncology. 2012; 13 (4): 269–275. (in Russian)].
19. Burak K., Angulo P., Pasha T.M., Egan K., Petz J., Lindor K.D. Incidence and risk factors for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. Am J Gastroenterol. 2004 Mar; 99 (3): 523–6. doi: 10.1111/j.1572-0241.2004.04067.x.
20. Shin H.R., Oh J.K., Masuyer E., Curado M.P., Bouvard V., Fang Y.Y., Wiangnon S., Sripa B., Hong S.T. Epidemiology of cholangiocarcinoma: an update focusing on risk factors. Cancer Sci. 2010 Mar; 101 (3): 579–85. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01458.x.
21. Liver Cancer Study Group of Japan. The general rules for the clinical and pathological study of primary liver cancer, 4th ed. Tokyo: Kanehara; 2000.
22. Onoe S., Shimoyama Y., Ebata T., Yokoyama Y., Igami T., Sugawara G., Nakamura S., Nagino M. Prognostic delineation of papillary cholangiocarcinoma based on the invasive proportion: a single-institution study with 184 patients. Surgery. 2014 Feb; 155 (2): 280–91. doi: 10.1016/j.surg.2013.08.011.
23. Lim J.H., Park C.K. Pathology of cholangiocarcinoma. Abdom Imaging. 2004 Sep-Oct; 29 (5): 540–7.
24. Patel T. Cholangiocarcinoma. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2006; 3: 33–42. doi: 10.1038/ncpgasthep0389.
25. Somer L., Andrejić B., Milošević P. Origin and pathological characteristics of Klatskin tumor: a case report and literature review. Pol J Pathol. 2012; 63 (1): 65–70.
26. Affo S., Yu L.X., Schwabe R.F. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. Annu Rev Pathol. 2017 Jan 24; 12: 153–186. doi: 10.1146/annurev-pathol-052016-100322.
27. Shimada H., Nimoto S., Nakagawa G., Kobayashi M., Tsuchiya S., Kudo T., Morita S. The infiltration of bile duct carcinoma along the bile duct wall. Int Surg. 1988 Apr-Jun; 73 (2): 87–90.
28. Natsume S., Ebata T., Yokoyama Y., Igami T., Sugawara G., Shimoyama Y., Nagino M. Clinical significance of left trisectionectomy for perihilar cholangiocarcinoma: an appraisal and comparison with left hepatectomy. Ann Surg. 2012 Apr; 255 (4): 754–62. doi: 10.1097/SLA.0b013e31824a8d82.
29. Nuzzo G., Giuliani F., Ardito F., Giovannini I., Aldrighetti L., Belli G., Bresadola F., Calise F., Dalla Valle R., D'Amico D.F., Gennari L., Giulini S.M., Guglielmi A., Jovine E., Pellicci R., Pernthaler H., Pinna A.D., Puleo S., Torzilli G., Capussotti L.; Italian Chapter of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association, Cillo U., Ercolani G., Ferrucci M., Mastrangelo L., Portolani N., Pulitanò C., Ribero D., Ruzzenente A., Scuderi V., Federico B. Improvement in perioperative and long-term outcome

after surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma: results of an Italian multicenter analysis of 440 patients. *Arch Surg.* 2012 Jan; 147 (1): 26–34. doi: 10.1001/archsurg.2011.771.

30. Namdar T., Raffel A., Topp S.A., am Esch J.S., Fürst G., Knoefel W.T., Eisenberger C.F. Intrahepatic cholestasis without jaundice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2009 Feb; 8 (1): 103–5.

31. Axiotis C.A., Smith G.J. Sclerosing carcinoma of the right hepatic duct at the porta hepatis: anicteric presentation of early hilar cholangiocarcinoma. *Am J Gastroenterol.* 1982 Jun; 77 (6): 414–8.

32. Kuang D., Wang G. Hilar cholangiocarcinoma: Pathology and tumor biology. *Front Med China.* 2010 Dec; 4 (4): 371–7. doi: 10.1007/s11684-010-0130-6.

33. Friman S. Cholangiocarcinoma – current treatment options. *Scand J Surg* 2011; 100: 30–34. doi: 10.1177/145749691110000106.

34. Ahrendt S.A., Pitt H.A., Nakeeb A., Klein A.S., Lillemoe K.D., Kalloo A.N., Cameron J.L. Diagnosis and management of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *J Gastrointest Surg.* 1999 Jul-Aug; 3 (4): 357–67.

35. Maguchi H., Takahashi K., Katanuma A., Osanai M., Nakahara K., Matuzaki S., Urata T., Iwano H. Preoperative biliary drainage for hilar cholangiocarcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2007; 14 (5): 441–6. doi: 10.1007/s00534-006-1192-3.

36. Magistrelli P., Masetti R., Coppola R., Coco C., Antinori A., Nuzzo G., Picciocchi A. Changing attitudes in the palliation of proximal malignant biliary obstruction. *J Surg Oncol Suppl.* 1993; 3: 151–3.

37. Jarnagin W.R., Burke E., Powers C., Fong Y., Blumgart L.H. Intrahepatic biliary enteric bypass provides effective palliation in selected patients with malignant obstruction at the hepatic duct confluence. *Am J Surg.* 1998 Jun; 175 (6): 453–60.

38. Burckhardt H., Müller W. Versuche über die Punktion der Gallenblase und ihre Röntgendarstellung. *Deutsch Zschr Chirurg.* 1921; 7: 161–169.

39. Wiechel K.L. Percutaneous transhepatic cholangiography. Technique and application. With studies of the hepatic venous and biliary duct pressures, the chemical changes in blood and bile and clinical results in a series of jaundiced patients. *Acta Chir Scand Suppl.* 1964; 11: SUPPL 330: 1–99.

40. Ившин В.Г., Якунин А.Ю., Лукичев О.Д. Чрескожные диагностические и желчеотводящие вмешательства у больных механической желтухой. Тула, 2000. 312. [Ivshin V.G., Yakunin A.Y., Lukichev O.D. Percutaneous diagnostic and cholereductic interventions in patients with obstructive jaundice. Tula, 2000. 312. (in Russian)].

41. Berquist T.H., May G.R., Johnson C.M., Adson M.A., Thistle J.L. Percutaneous biliary decompression: internal and external drainage in 50 patients. *Am J Roentgenol.* 1981 May; 136 (5): 901–6. doi: 10.2214/ajr.136.5.901.

42. Carrasco C.H., Zomoza J., Bechtel W.J. Malignant biliary obstruction: complications of percutaneous biliary drainage. *Radiology.* 1984 Aug; 152 (2): 343–6.

43. Мезенцев С.С., Кут О.И., Колесников Е.Н., Снежко А.В., Фоменко Ю.А., Черняк М.Н. Мини-инвазивные операции желчеотведения при механической желтухе опухолевого генеза. Современные проблемы науки и образования. 2017; 3: 73. [Mezentsev S.S., Keith O.I., Kolesnikov E.N., Snezhko A.V., Fomenko Yu.A., Chernyak M.N. Mini-invasive operations of bile excretion in obstructive jaundice of tumor genesis. Modern problems of science and education. 2017; 3: 73. (in Russian)].

44. Кулезнева Ю.В., Израйлов Р.Е., Уракова Н.А. Чрескожное чреспеченочное стентирование желчных протоков. Показания, методика, результаты. *Диагностическая и интервенционная радиология.* 2008; 2 (4): 87–92. [Kulezneva Y.V., Izrailov R.E., Urakova N.A. Percutaneous transhepatic biliary ducts stenting. Indications, results. *Diagnostic Interventional Radiology.* 2008; 2 (4): 87–92. (in Russian)].

45. Nennstiel S., Weber A., Frick G., Haller B., Meining A., Schmid R.M., Neu B. Drainage-related Complications in Percutaneous Transhepatic Biliary Drainage: An Analysis Over 10 Years. *J Clin Gastroenterol.* 2015 Oct; 49 (9): 764–70. doi: 10.1097/MCG.0000000000000275.

46. Shimizu S., Tada M., Fujimoto S., Kawai K. Diagnostic ERCP. *Endoscopy.* 1992 Jan-Feb; 24 (1–2): 95–9.

47. Soehendra N., Reynders-Frederix V. Palliative bile duct drainage – a new endoscopic method of introducing a transpapillary drain. *Endoscopy.* 1980 Jan; 12 (1): 8–11. doi: 10.1055/s-2007-1021702.

48. Галлингер Ю.И., Аныкин В.Ф., Висанта Д. Эндоскопическое эндопротезирование при рубцовых и бластоматозных поражениях гепатикохоledоха. Материалы Всероссийской научной конференции хирургов. Свердловск. 1990; 20–21. [Gallinger Y.I., Unikin V.F., Visanta D. Endoscopic endoprosthesis for cicatricial and blastomatous lesions of the hepaticocoledochus. Abstracts of Russian Sciences Conferences of Surgeries. Sverdlovsk. 1990; 20–21. (in Russian)].

49. Neuhaus H., Hagenmüller F., Classen M. Self-expanding biliary stents: preliminary clinical experience. *Endoscopy.* 1989 Sep; 21 (5): 225–8. doi: 10.1055/s-2007-1012954.

50. Deviere J., Baize M., de Toef J., Cremer M. Long-term follow-up of patients with hilar malignant stricture treated by endoscopic internal biliary drainage. *Gastrointest Endosc.* 1988 Mar-Apr; 34 (2): 95–101.

51. Будзинский С.А., Шаповальянц С.Г., Федоров Е.Д., Мьльников А.Г., Паньков А.Г., Чернякевич П.Л. Возможности эндоскопического ретроградного стентирования желчных протоков при злокачественных опухолях органов панкреатобилиарной зоны, осложненных механической желтухой. Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь». 2013; (2): 57–65. [Budzinsky S.A., Shapovalyants S.G., Fedorov E.D., Mylnikov A.G., Pan'kov A.G., Chernyakevich P.L. The possibilities of endoscopic retrograde stenting of the bile ducts in malignant tumors of the organs of the pancreatobiliary zone, complicated by obstructive jaundice. *Russian Sklifosovsky Journal «Emergency Medical Care».* 2013; (2): 57–65. (in Russian)].

52. Tang Z., Yang Y., Meng W., Li X. Best option for preoperative biliary drainage in Klatskin tumor: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2017 Oct; 96 (43): e8372. doi: 10.1097/MD.00000000000008372.

53. Moole H., Dharmapuri S., Duvvuri A., Dharmapuri S., Bodireddy R., Moole V., Yedama P., Bondalapati N., Uppu A., Yerasi C. Endoscopic versus Percutaneous Biliary Drainage in Palliation of Advanced Malignant Hilar Obstruction: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2016; 2016: 4726078. doi: 10.1155/2016/4726078.

54. Lee T.Y., Cheon Y.K., Shim C.S. Current Status of Photodynamic Therapy for Bile Duct Cancer. *Clin Endosc.* 2013 Jan; 46 (1): 38–44. doi: 10.5946/ce.2013.46.1.38.

55. Lee T.Y., Cheon Y.K., Shim C.S. Photodynamic Therapy in Patients with Advanced Hilar Cholangiocarcinoma: Percutaneous Cholangioscopic Versus Peroral Transpapillary Approach. *Photomed Laser Surg.* 2016 Apr; 34 (4): 150–6. doi: 10.1089/pho.2015.3989.

56. Lee T.Y., Cheon Y.K., Shim C.S., Cho Y.D. Photodynamic therapy prolongs metal stent patency in patients with unresectable hilar cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2012 Oct 21; 18 (39): 5589–94. doi: 10.3748/wjg.v18.i39.5589.

57. Шаповальянц С.Г., Орлов С.Ю., Федоров Е.Д., Будзинский С.А. Эндоскопические методы в лечении рубцовых послеоперационных стриктур желчевыводящих протоков. Анналы хирургической гепатологии. 2002; 2 (2): 70–77. [Shapoval'yants S.G., Orlov S.Yu., Fedorov E.D., Budzinski S.A. Endoscopic methods in the treatment of cicatricial postoperative strictures of the bile ducts. *Annals of surgical hepatology.* 2002; 2 (2): 70–77. (in Russian)].

58. Zoepf T., Jakobs R., Arnold J.C., Apel D., Riemann J.F. Palliation of nonresectable bile duct cancer: improved survival after photodynamic therapy. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2426–30. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.00318.x.

59. Dolak W., Schreiber F., Schwaighofer H., Gschwanter M., Plieschnegger W., Ziahehab A., Mayer A., Kramer L., Kopecky A., Schrutka-Köbl C., Wolkersdorfer G., Madl C., Berr F., Trauner M., Püspök A.; Austrian Biliary REA Study Group. Endoscopic radiofrequency ablation for malignant biliary obstruction: nation wide retrospective study of 84 consecutive applications. *Surg Endosc.* 2014 Mar; 28 (3): 854–60. doi: 10.1007/s00464-013-3232-9.

60. Тарасюк Т.И., Вишневецкий В.А. Хирургическое лечение рака проксимальных желчных протоков. Анналы хирургической гепатологии. 2003; 8 (2): 33–42. [Tarasyuk T.I., Vishnevsky V.A. Surgical treatment of cancer of the proximal bile ducts. *Annals of surgical hepatology.* 2003; 8 (2): 33–42. (in Russian)].

61. Molina V., Sampson J., Ferrer J., Sanchez-Cabus S., Calatayud D., Pavel M.C., Fondevila C., Fuster J., Garcia-Valdecasas J.C. Klatskin tumor: Diagnosis, preoperative evaluation and surgical considerations. *Cir Esp.* 2015 Nov; 93 (9): 552–60. doi: 10.1016/j.ciresp.2015.07.003.

62. Groot Koerkamp B., Wiggers J.K., Allen P.J., Besselink M.G., Blumgart L.H., Busch O.R., Coelen R.J., D'Angelica M.I., DeMatteo R.P., Gouma D.J., Kingham T.P., Jarnagin W.R., van Gulik T.M. Recurrence Rate and Pattern of Perihilar Cholangiocarcinoma after Curative Intent Resection. *J Am Coll Surg.* 2015 Dec; 221 (6): 1041–9. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.09.005.

63. Jarnagin W.R., Ruol L., Little S.A., Klimstra D., D'Angelica M., DeMatteo R.P., Wagman R., Blumgart L.H., Fong Y. Patterns of initial disease recurrence after resection of gallbladder carcinoma and hilar cholangiocarcinoma: implications for adjuvant therapeutic strategies. *Cancer.* 2003 Oct 15; 98 (8): 1689–700. doi: 10.1002/encr.11699.

64. Paul A., Kaiser G.M., Molmenti E.P., Schroeder T., Vernadakis S., Oezcelik A., Baba H.A., Cicinnati V.R., Sotiropoulos G.C. Klatskin tumors and the accuracy of the Bismuth-Corlette classification. *Am Surg.* 2011 Dec; 77 (12): 1695–9.

65. European Association for the Study of the Liver (EASL). Clinical guidelines EASL: liver transplantation. *J Hepatol.* 2016 Feb; 64 (2): 433–485. doi: 10.1016/j.jhep.2015.10.006.

66. Ghali P, Marotta P.J., Yoshida E.M., Bain V.G., Marleau D., Peltekian K., Metrakos P., Deschênes M. Liver transplantation for incidental cholangiocarcinoma: analysis of the Canadian experience. *Liver Transpl* 2005; 11: 1412–1416. doi: 10.1002/lt.20512.
67. Meyer C.G., Penn I., James L. Liver transplantation for cholangiocarcinoma: results in 207 patients. *Transplantation*. 2000 Apr 27; 69 (8): 1633–7.
68. Общероссийская общественная организация трансплантологов «Российское трансплантологическое общество». Трансплантация печени. Национальные клинические рекомендации. 2013; 42. [Russian Transplant Society]. Liver transplantation. National clinical guidelines. 2013; 42. (in Russian)].
69. Heimbach J.K., Gores G.J., Haddock M.G., Alberts S.R., Pedersen R., Kremers W., Nyberg S.L., Ishitani M.B., Rosen C.B. Predictors of disease recurrence following neoadjuvant chemoradiotherapy and liver transplantation for unresectable perihilar cholangiocarcinoma. *Transplantation*. 2006; 82: 1703–1707. doi: 10.1097/01.tp.00000253551.43583.d1.
70. Ethun C.G., Lopez-Aguilar A.G., Anderson D.J., Adams A.B., Fields R.C., Doyle M.B., Chapman W.C., Krasnick B.A., Weber S.M., Mezrich J.D., Salem A., Pawlik T.M., Poultsides G., Tran T.B., Idrees K., Isom C.A., Martin R.C.G., Scoggins C.R., Shen P., Mogal H.D., Schmidt C., Beal E., Hatzaras I., Shenoy R., Cardona K., Maithe S.K. Transplantation Versus Resection for Hilar Cholangiocarcinoma: An Argument for Shifting Treatment Paradigms for Resectable Disease. *Ann Surg*. 2018 May; 267 (5): 797–805. doi: 10.1097/SLA.0000000000002574.
71. Heimbach J.K., Gores G.J., Haddock M.G., Alberts S.R., Nyberg S.L., Ishitani M.B., Rosen C.B. Liver transplantation for unresectable perihilar cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*. 2004; 24 (2): 201–7. doi: 10.1055/s-2004-828896.
72. Gores G.J., Darwish Murad S., Heimbach J.K., Rosen C.B. Liver transplantation for perihilar cholangiocarcinoma. *Dig Dis*. 2013; 31 (1): 126–9. doi: 10.1159/000347207.
73. Glimelius B., Hoffman K., Sjöden P.O., Jacobsson G., Sellström H., Enander L.K., Linné T., Svensson C. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol*. 1996 Aug; 7 (6): 593–600.
74. Tsavaris N., Kosmas C., Gouveris P., Gennatas K., Polyzos A., Mouratidou D., Tsiaras H., Margaritis H., Papastratis G., Tzima E., Papadoniou N., Karatzas G., Papalambros E. Weekly gemcitabine for the treatment of biliary tract and gallbladder cancer. *Invest New Drugs*. 2004 Apr; 22 (2): 193–8. doi: 10.1023/B:DRUG.0000011797.09549.53.
75. Eckel F., Schmid R.M. Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: a pooled analysis of clinical trials. *Br J Cancer*. 2007 Mar 26; 96 (6): 896–902. doi: 10.1038/sj.bjc.6603648.
76. Fukutomi A., Furuse J., Okusaka T., Miyazaki M., Taketsuna M., Koshiji M., Nimura Y. Effect of biliary drainage on chemotherapy in patients with biliary tract cancer: an exploratory analysis of the BT22 study. *HPB (Oxford)*. 2012 Apr; 14 (4): 221–7. doi: 10.1111/j.1477-2574.2011.00431.x.
77. Ede R.J., Williams S.J., Hatfield A.R., McIntyre S., Mair G. Endoscopic management of inoperable cholangiocarcinoma using iridium-192. *Br J Surg*. 1989 Aug; 76 (8): 867–9.
78. Righi D., Maass J., Zanon E., Tettoni S., Orecchia R., Lazzari R., Ragona R., Gandini G. Percutaneous treatment of hilar cholangiocarcinoma completed by high-dose rate brachytherapy. Experience in the first 5 cases. *Radiol Med*. 1994 Jul-Aug; 88 (1–2): 79–85.
79. Ohnishi H., Asada M., Shichijo Y., Iijima N., Itobayashi E., Shimura K., Suzuki T., Yoshida S., Mine T. External radiotherapy for biliary decompression of hilar cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology*. 1995 Jul; 42 (3): 265–8.
80. Weiss M.J., Cosgrove D., Herman J.M., Rastegar N., Kamel I., Pawlik T.M. Multimodal treatment strategies for advanced hilar cholangiocarcinoma. *Langenbecks Arch Surg*. 2014 Aug; 399 (6): 679–92. doi: 10.1007/s00423-014-1219-1.
81. Gkika E., Hallauer L., Kirste S., Adebahr S., Bartl N., Neeff H.P., Fritsch R., Brass V., Nestle U., Grosu A.L., Brunner T.B. Stereotactic body radiotherapy (SBRT) for locally advanced intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Cancer*. 2017 Nov 21; 17 (1): 781. doi: 10.1186/s12885-017-3788-1.
82. Mahadevan A., Dagoglu N., Mancias J., Raven K., Khwaja K., Tseng J.F., Ng K., Enzinger P., Miksad R., Bullock A., Evenson A. Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT) for Intrahepatic and Hilar Cholangiocarcinoma. *J Cancer*. 2015 Aug 1; 6 (11): 1099–104. doi: 10.7150/jca.13032.
83. Gerhards M.F., van Gulik T.M., González González D., Rauws E.A., Gouma D.J. Results of postoperative radiotherapy for resectable hilar cholangiocarcinoma. *World J Surg*. 2003 Feb; 27 (2): 173–9. doi: 10.1007/s00268-002-6434-1.
84. Shinohara E.T., Mitra N., Guo M., Metz J.M. Radiation therapy is associated with improved survival in the adjuvant and definitive treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008 Dec 1; 72 (5): 1495–501. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.03.018.
85. Shinohara E.T., Mitra N., Guo M., Metz J.M. Radiotherapy is associated with improved survival in adjuvant and palliative treatment of extrahepatic cholangiocarcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Jul 15; 74 (4): 1191–8. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.09.017.
86. Xu X., Li J., Wu J., Zhu R., Ji W. A Systematic Review and Meta-analysis of Intraluminal Brachytherapy Versus Stent Alone in the Treatment of Malignant Obstructive Jaundice. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2018 Feb; 41 (2): 206–217. doi: 10.1007/s00270-017-1827-6.
87. Нечушкин М.И., Долгушин Б.И., Памтюко Ю.И., Макаров Е.С., Андросов Н.С., Лагошный А.Т., Сушичина М.А. Контактная внутривидеотерапия лучевой терапией больных местно-распространенным иноперабельным раком проксимальных желчных протоков. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 1994; 5 (S): 76–80. [Nechushkin M.I., Dolgushin B.I., Pamyutko Yu.I., Makarov E.S., Androsov N.S., Lagoshny A.T., Sushchyna M.A. Contact intraductal radiotherapy in patients with locally advanced inoperable cancer of the proximal bile duct. *Vestnik N.N. Blokhina RAMS*. 1994; 5 (S): 76–80. (in Russian)].
88. Pollom E.L., Alagappan M., Park L.S., Whitemore A.S., Koong A.C., Chang D.T. Does radiotherapy still have a role in unresected biliary tract cancer? *Cancer Med*. 2017 Jan; 6 (1): 129–141. doi: 10.1002/cam4.975.
89. Yoshioka Y., Ogawa K., Oikawa H., Onishi H., Kanesaka N., Tamamoto T., Kosugi T., Hatano K., Kobayashi M., Ito Y., Takayama M., Takemoto M., Karasawa K., Nagakura H., Imai M., Kosaka Y., Yamazaki H., Isohashi F., Nemoto K., Nishimura Y.; Japanese Radiation Oncology Study Group (JROSG). Impact of intraluminal brachytherapy on survival outcome for radiation therapy for unresectable biliary tract cancer: a propensity-score matched-pair analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014 Jul 15; 89 (4): 822–9. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.04.020.
90. Chandrasekhara V., Topazian M. Biliary radiofrequency ablation: burning issues. *Gastrointest Endosc*. 2018 Sep; 88 (3): 519–520. doi: 10.1016/j.gie.2018.05.006.
91. ASGE Technology Committee, Navaneethan U., Thosani N., Goodman A., Manfredi M., Pannala R., Parsi M.A., Smith Z.L., Sullivan S.A., Banerjee S., Maple J.T. Radiofrequency ablation devices. *VideoGIE*. 2017 Sep 28; 2 (10): 252–259. doi: 10.1016/j.vgie.2017.06.002.
92. McGahan J.P., Brock J.M., Tesluk H., Gu W.Z., Schneider P., Browning P.D. Hepatic ablation with use of radio-frequency electrocautery in the animal model. *J Vasc Interv Radiol*. 1992 May; 3 (2): 291–7.
93. Афанасьев С.Г., Тузиков С.А. Нерезектабельные опухоли печени (обзор литературы). *Сибирский онкологический журнал*. 2006; 1: 49–54. [Afanasyev S.G., Tuzikov S.A. Inoperable liver tumors (literature review). *Siberian Journal of Oncology*. 2006; 1: 49–54. (in Russian)].
94. Buscarini L., Rossi S., Fornari F., Di Stasi M., Buscarini E. Laparoscopic ablation of liver adenoma by radiofrequency electrocautery. *Gastrointest Endosc*. 1995 Jan; 41 (1): 68–70.
95. Steel A.W., Postgate A.J., Khorsandi S., Nicholls J., Jiao L., Vliavinos P., Habib N., Westaby D. Endoscopically applied radiofrequency ablation appears to be safe in the treatment of malignant biliary obstruction. *Gastrointest Endosc*. 2011 Jan; 73 (1): 149–53. doi: 10.1016/j.gie.2010.09.031.
96. Zacharoulis D., Lazoura O., Sioka E., Potamianos S., Tzovaras G., Nicholls J., Koukoulis G., Habib N. Habib EndoHPB: a novel endobiliary radiofrequency ablation device. An experimental study. *J Invest Surg*. 2013 Feb; 26 (1): 6–10. doi: 10.3109/08941939.2012.681832.
97. Itoi T., Isayama H., Sofuni A., Itokawa F., Tamura M., Watanabe Y., Moriyasu F., Kahaleh M., Habib N., Nagao T., Yokoyama T., Kasuya K., Kawakami H. Evaluation of effects of a novel endoscopically applied radiofrequency ablation biliary catheter using an ex-vivo pig liver. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2012 Sep; 19 (5): 543–7. doi: 10.1007/s00534-011-0465-7.
98. Cho J.H., Lee K.H., Kim J.M., Kim Y.S., Lee D.H., Jeong S. Safety and effectiveness of endobiliary radiofrequency ablation according to the different power and target temperature in a swine model. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017 Feb; 32 (2): 521–526. doi: 10.1111/jgh.13472.
99. Tal A.O., Vermehren J., Friedrich-Rust M., Bojunga J., Sarrazin C., Zeuzem S., Trojan J., Albert J.G. Intraductal endoscopic radiofrequency ablation for the treatment of hilar non-resectable malignant bile duct obstruction. *World J Gastrointest Endosc*. 2014 Jan 16; 6 (1): 13–9. doi: 10.4253/wjge.v6.i1.13.
100. Topazian M., Levy M.J., Patel S., Charlton M.R., Baron T.H. Hepatic artery pseudoaneurysm formation following intraductal biliary radiofrequency ablation. *Endoscopy*. 2013; 45, Suppl 2: E161–2. doi: 10.1055/s-0032-1326644.
101. Cho J.H., Jeong S., Kim E.J., Kim J.M., Kim Y.S., Lee D.H. Long-term results of temperature-controlled endobiliary radiofrequency ablation in a normal swine model. *Gastrointest Endosc*. 2018 Apr; 87 (4): 1147–1150. doi: 10.1016/j.gie.2017.09.013.
102. Livraghi T., Solbiati L., Meloni M.F., Gazelle G.S., Halpern E.F., Goldberg S.N. Treatment of focal liver tumors with percutaneous radiofrequency ablation: complications encountered in a multicenter study. *Radiology*. 2003 Feb; 226 (2): 441–51. doi: 10.1148/radiol.2262012198.

103. Долгушин Б.И., Патютко Ю.И., Шолохов В.Н., Косарев В.Ю. Радиочастотная термоабляция опухолей печени. М., 2007; 39–44. [Dolgushin B.I., Patyutko Yu.I., Sholokhov V.N., Kosarev V.Yu. Radiofrequency thermoablation of liver tumors. Moscow, 2007; 39–44. (in Russian)].
104. Wang J., Zhao L., Zhou C., Gao K., Huang Q., Wei B., Gao J. Percutaneous Intraductal Radiofrequency Ablation Combined with Biliary Stent Placement for Nonresectable Malignant Biliary Obstruction Improves Stent Patency but not Survival. *Medicine* (Baltimore). 2016 Apr; 95 (15): e3329. doi: 10.1097/MD.0000000000003329.
105. Узденский А.Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. СПб.: Наука, 2010. 3–4. [Uzdenkii A.B. Cellular molecular mechanisms of photodynamic therapy. St. Petersburg: Science, 2010. 3–4. (in Russian)].
106. McCaughan J.S.Jr., Mertens B.F., Cho C., Barabash R.D., Payton H.W. Photodynamic therapy to treat tumors of the extrahepatic biliary ducts. A case report. *Arch Surg*. 1991 Jan; 126 (1): 111–3.
107. Ortner M.E., Caca K., Berr F., Liebetruhl J., Mansmann U., Huster D., Voderholzer W., Schachschal G., Mössner J., Lochs H. Successful photodynamic therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study. *Gastroenterology*. 2003; 125 (5): 1355–1363.
108. Zoepf T., Jakobs R., Arnold J.C., Apel D., Riemann J.F. Palliation of nonresectable bile duct cancer: improved survival after photodynamic therapy. *Am J Gastroenterol*. 2005; 100 (11): 2426–30. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.00318.x.
109. Lu Y., Liu L., Wu J.C., Bie L.K., Gong B. Efficacy and safety of photodynamic therapy for unresectable cholangiocarcinoma: A meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2015 Dec; 39 (6): 718–24. doi: 10.1016/j.clinre.2014.10.015.
110. Shim C.S., Cheon Y.K., Cha S.W., Bhandari S., Moon J.H., Cho Y.D., Kim Y.S., Lee L.S., Lee M.S., Kim B.S. Prospective study of the effectiveness of percutaneous transhepatic photodynamic therapy for advanced bile duct cancer and the role of intraductal ultrasonography in response assessment. *Endoscopy*. 2005 May; 37 (5): 425–33. doi: 10.1055/s-2005-861294.
111. Moole H., Tathireddy H., Dharmapuri S., Moole V., Boddireddy R., Yedama P., Dharmapuri S., Uppu A., Bondalapati N., Duvvuri A. Success of photodynamic therapy in palliating patients with nonresectable cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2017 Feb 21; 23 (7): 1278–1288. doi: 10.3748/wjg.v23.i7.1278.
112. Cheon Y.K., Cho Y.D., Baek S.H., Cha S.W., Moon J.H., Kim Y.S., Lee J.S., Lee M.S., Shim C.S., Kim B.S. Comparison of survival of advanced hilar cholangiocarcinoma after biliary drainage alone versus photodynamic therapy with external drainage. *Korean J Gastroenterol* 2004; 44: 280–287.
113. Wiedmann M., Berr F., Schiefke I., Witzigmann H., Kohlhaw K., Mössner J., Caca K. Photodynamic therapy in patients with non-resectable hilar cholangiocarcinoma: 5-year follow-up of a prospective phase II study. *Gastrointest Endosc*. 2004 Jul; 60 (1): 68–75.
114. Witzigmann H., Berr F., Ringel U., Caca K., Uhlmann D., Schoppmeyer K., Tannapfel A., Wittekind C., Mössner J., Hauss J., Wiedmann M. Surgical and palliative management and outcome in 184 patients with hilar cholangiocarcinoma: palliative photodynamic therapy plus stenting is comparable to r1/r2 resection. *Ann Surg* 2006; 244: 230–239. doi: 10.1097/01.sla.0000217639.10331.47.
115. Dumoulin F.L., Gerhardt T., Fuchs S., Scheurlen C., Neubrand M., Layer G., Sauerbruch T. Phase II study of photodynamic therapy and metal stent as palliative treatment for nonresectable hilar cholangiocarcinoma. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 860–867. doi: 10.1067/mge.2003.250.
116. Prasad G.A., Wang K.K., Baron T.H., Buttar N.S., Wongkeesong L.M., Roberts L.R., LeRoy A.J., Lutzke L.S., Borkenhagen L.S. Factors associated with increased survival after photodynamic therapy for cholangiocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Jun; 5 (6): 743–8. doi: 10.1016/j.cgh.2007.02.021.
117. Wagner A., Kiesslich T., Neureiter D., Friesenbichler P., Puspok A., Denzer U.W., Wolkersdörfer G.W., Emmanuel K., Lohse A.W., Berr F. Photodynamic therapy for hilar bile duct cancer: clinical evidence for improved tumoricidal tissue penetration by temoporfin. *Photochem Photobiol Sci*. 2013; 12: 1065–1073. doi: 10.1039/c3pp25425a.
118. Everhart J.E., Ruhl C.E. Burden of digestive disease in the United States, Part III: Liver, biliary tract, and pancreas. *Gastroenterology*. 2009 Apr; 136 (4): 1134–44. doi: 10.1053/j.gastro.2009.02.038.

Поступила/Received 09.10.18
Принята в печать/Accepted 28.12.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Францев Дмитрий Юрьевич, аспирант рентгенодиагностического отделения, НИИ клинической и экспериментальной радиологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Н.Н. Блохина» МЗ России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 7864-5396. AuthorID (РИНЦ): 1014031. ORCID: 0000-0002-6331-5611. E-mail: frantsev_d@mail.ru.

Сергеева Ольга Николаевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории интервенционной радиологии, НИИ клинической и экспериментальной радиологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Н.Н. Блохина» МЗ России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 5427-7357. AuthorID (РИНЦ): 907223. ORCID: 0000-0003-1932-5983.

Долгушин Борис Иванович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор НИИ клинической и экспериментальной радиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. Н.Н. Блохина» МЗ России (г. Москва, Россия). SPIN-код: 2623-8259. AuthorID (РИНЦ): 313365. ORCID: 0000-0001-7185-7165.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Dmitry Yu. Frantsev, MD, Postgraduate, Radiology Department; Research Institute of Clinical and Experimental Radiology, N.N. Blokhin National Medical Research (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0002-6331-5611. E-mail: frantsev_d@mail.ru.

Olga N. Sergeeva, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Interventional Radiology, Research Institute of Clinical and Experimental Radiology, N.N. Blokhin National Medical Research (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0003-1932-5983.

Boris I. Dolgushin, MD, DSc, Professor, Member of the Russian Academy of Sciences, Director of Research Institute of Clinical and Experimental Radiology, N.N. Blokhin National Medical Research (Moscow, Russia). ORCID: 0000-0001-7185-7165.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Для цитирования: Виллерт А.Б., Коломиец Л.А., Юнусова Н.В., Иванова А.А. Асцит как предмет исследований при раке яичников. Сибирский онкологический журнал. 2019; 18 (1): 116–123. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-116-123.
For citation: Villert A.B., Kolomiets L.A., Yunusova N.V., Ivanova A.A. Ascites as a subject of studies in ovarian cancer. Siberian Journal of Oncology. 2019; 18 (1): 116–123. – doi: 10.21294/1814-4861-2019-18-1-116-123.

АСЦИТ КАК ПРЕДМЕТ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

А.Б. Виллерт¹, Л.А. Коломиец^{1,2}, Н.В. Юнусова^{1,2}, А.А. Иванова¹

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

Россия, г. Томск, 634009, пер. Кооперативный, 5. E-mail: avillert@yandex.ru¹

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия²

Россия, г. Томск, 634050, Московский тракт, 2. E-mail: KolomietsLA@oncology.tomsk.ru²

Аннотация

Рак яичников (РЯ) представляет собой неоднородную группу опухолей, различающихся этиологией и клиническим течением. Наиболее часто встречающийся гистотип – High-grade серозный рак яичников, который в большинстве случаев диагностируется на диссеминированной стадии и сопровождается асцитом. Перитонеальная диссеминация является одним из наиболее неблагоприятных факторов прогрессирования злокачественных опухолей. Наличие асцита увеличивает точность ультразвуковой диагностики канцероматоза. Однако прогностические факторы, связанные с злокачественным асцитом при раке яичников, изучены недостаточно. Среди клинических параметров наибольшую прогностическую информацию несет количество асцитической жидкости – малоасцитные раки обладают более благоприятным лечебным прогнозом и взаимосвязаны с рядом иммунологических особенностей, позволяющих вынести их в отдельную подгруппу. Асцитическая жидкость является легкодоступным и ценным источником клеточного и внеклеточного компонентов, задействованных в овариальном канцерогенезе. Среди растворимых высоко- и низкомолекулярных компонентов асцита ведется активный поиск дополнительных прогностических и предикторных факторов, позволяющих уточнить молекулярный фенотип рака и персонализировать лечение больных РЯ.

Ключевые слова: асцит, рак яичников, визуализация, компоненты асцита, прогноз, патогенез, мезотелиальные клетки, перитонеальный канцерогенез, ультразвуковое исследование, иммуноцитохимия.

ASCITES AS A SUBJECT OF STUDIES IN OVARIAN CANCER

A.B. Villert¹, L.A. Kolomiets^{1,2}, N.V. Yunusova^{1,2}, A.A. Ivanova¹

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

5, Kooperativny Street, 634009-Tomsk, Russia. E-mail: avillert@yandex.ru¹

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia²

2, Moskovsky trakt, Tomsk-634050, Russia. E-mail: KolomietsLA@oncology.tomsk.ru²

Abstract

Ovarian cancer is a highly heterogeneous disease characterized by multiple histological subtypes. High-grade serous ovarian carcinoma is the most common histological subtype of ovarian cancer. The majority of ovarian cancer patients present with malignant ascites at diagnosis. Peritoneal dissemination is one of the most unfavorable factors for tumor progression and recurrence. A more precise visualization of peritoneal carcinomatosis can be achieved by transabdominal ultrasound. However, the prognostic factors associated with malignant ascites in ovarian cancer are currently not well understood. Among the clinical parameters, the volume of ascites has the greatest information in terms of prognosis of disseminated ovarian cancer. Ovarian cancer with small-volume ascites has a more favorable therapeutic prognosis. Ascites is an easily accessible and valuable source of cellular and extracellular components contained in it that are involved in

ovarian carcinogenesis. Ascites represents an accessible and valuable source of material to identify signals that influence tumor growth. At present, among the soluble high- and low molecular components of ascites, an active search for additional prognostic and predictor factors is being conducted, providing insights into the molecular mechanisms for clinical phenotypes of ovarian cancer.

Key words: ascites, ovarian cancer, visualization, ascite components, prognosis, pathogenesis, mesothelial cells, peritoneal carcinogenesis, ultrasound, immunocytochemistry.

Актуальность изучения рака яичников (РЯ) обусловлена большим количеством нерешенных вопросов, связанных с поздней диагностикой, сложностями в выборе тактики лечения, высокой долей рецидивов, и в конечном итоге низкими показателями эффективности лечения и высокими показателями летальности. Клиническое течение РЯ различно даже в пределах морфологически однородной группы пациентов в связи с высокой степенью гетерогенности опухоли. Остаются нерешенными вопросы о том, насколько широк спектр молекулярно-генетических маркеров и какова корреляция между их уровнем и эффективностью лечения РЯ. Обсуждается возможность создания алгоритма противоопухолевой терапии на основании результатов исследования. Поиск маркеров эффективности лечения не должен ограничиваться исследованием лишь тканевых маркеров. Одним из перспективных путей получения информации о характере опухолевого процесса при РЯ может быть исследование асцитической жидкости (АЖ).

Патогенетические аспекты асцита.

Классификации асцита

Асцит (от греч. «askos» – сумка, мешок) – это состояние, при котором наблюдается патологическое накопление жидкости в брюшной полости. Фоном для развития асцита в 81,5 % являются заболевания печени, в 10 % – злокачественные опухоли, в 3 % – застойная сердечная недостаточность, в 1,7 % – туберкулёзный перитонит, более редкие причины – нефротический синдром, острый панкреатит [1]. Эпителиальные злокачественные опухоли яичников, эндометрия, молочной железы, толстой кишки, желудка и поджелудочной железы обуславливают более 80 % случаев злокачественных асцитов [2, 3]. При этом наиболее распространенной первичной

локализацией рака, сопровождающейся асцитом, является РЯ, составляя до 38 % случаев асцитов, ассоциированных со злокачественными опухолями у женщин [4, 5].

Перитонеальная мембрана покрывает висцеральные органы, а также абдоминальную и тазовую области и состоит из 5 слоёв (рис. 1). Первый слой состоит из эндотелиальных клеток, которые выстилают внутрисосудистое пространство капилляров. Эти клетки имеют экстраклеточный (внеклеточный) гликокаликс и фиксированный анионный заряд, который затрудняет прохождение крупных молекул белков плазмы крови, например альбумина, через стенки капилляров. Внутриклеточные поры обеспечивают внутриклеточный транспорт через этот слой. Второй слой представлен базальной мембраной. Интерстициальное пространство (третий слой), которое содержит фибробласты, коллаген и гиалуроновую кислоту, может блокировать диффузию макромолекул до субмезотелиальной базальной мембраны (четвертый слой). Заключительный слой состоит из мезотелиальных клеток. Связываясь плотными соединениями и секретируя поверхностные гликозаминогликаны в абдоминальное пространство, мезотелиальные клетки предоставляют эффективную антиадгезивную поверхность и защитный барьер против физического повреждения. В физиологических условиях разница в онкотическом давлении через перитонеальную мембрану (высокое в эндотелиальном слое и низкое в мезотелиальном слое) ограничивает капиллярную фильтрацию жидкости и предотвращает отек, который возникает из-за реабсорбции воды в капилляры из интерстициального пространства [6].

Механизм образования асцита при перитонеальном канцероматозе сложен и в значительной

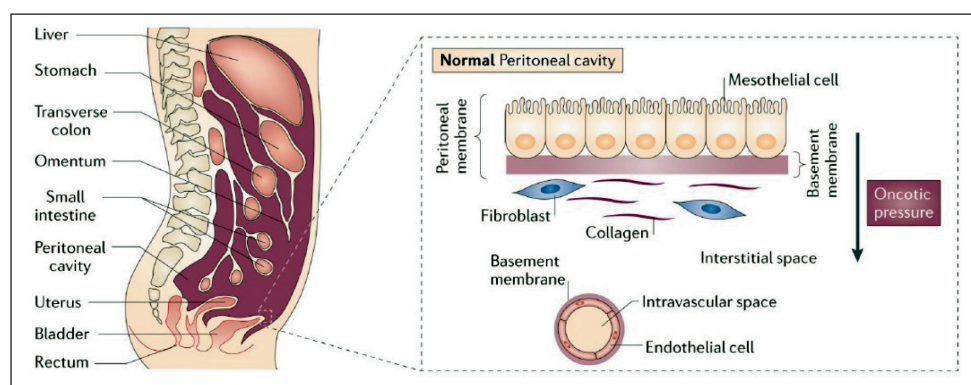


Рис. 1. Строение перитонеальной мембраны [6]

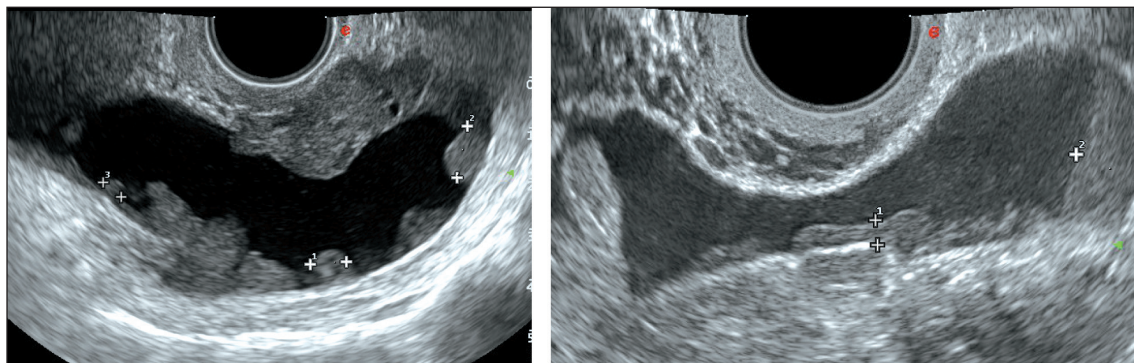


Рис. 2. УЗИ малого таза. Канцероматоз брюшины на фоне асцита, визуализируются участки канцероматоза брюшины в виде узлов солидного строения размерами от 5 мм до 26 мм [17]

степени обусловлен сочетанием повышенного поступления жидкости в брюшную полость и снижением ее оттока [6, 7]. У больных с абдоминальными опухолями площадь поперечного сечения микрососудов, выстилающих брюшную полость, увеличивается, и это приводит к повышенной фильтрации жидкости. Вдобавок, злокачественный асцит имеет высокую концентрацию белка, который вторичен по отношению к повышенной проницаемости капилляров [7]. Гиперпродукция VEGF опухолью обеспечивает повышенную проницаемость капилляров (выход жидкости, белков, ростовых факторов). Растущая опухоль инициирует в брюшной полости провоспалительный ответ, тем самым способствуя прикреплению опухолевых клеток на поверхности брюшины. Нарушение реабсорбции асцитической жидкости обусловлено и механическим сдавлением путей лимфооттока, увеличением вязкости лимфы, ретроградным током лимфы. Любой из механизмов, включая нарушение лимфатического дренажа [8, 9], изменение проницаемости сосудов [8], уменьшение внутрисосудистого онкотического давления вследствие гипоальбуминемии, может быть отягощен изменением концентрации натрия и задержкой жидкости за счет коморбидной патологии печени или хронической сердечной недостаточности.

Некоторые анатомо-физиологические факторы (внутрибрюшное давление, подвижность внутренних органов) обуславливают специфику накопления АЖ по мере развития опухоли.

В клинической практике удобна классификация асцита, предложенная Международным клубом по изучению асцита (International Ascetic Club), по которой выделяют три степени: 1-я степень – жидкость в брюшной полости определяется только при ультразвуковом исследовании, 2-я степень проявляется симметричным увеличением живота, 3-я степень – напряженный асцит [10]. По количеству жидкости в брюшной полости можно провести несколько иную градацию степени асцита: 1-я степень – не более 3 л, 2-я степень – более 3 л (4–6 л), 3-я степень – от 10 до 20 л АЖ [11, 12].

Ультразвуковое исследование позволяет выявлять субклинический асцит или асцит малого объема (АМО) [13]. При эхографии наличие свободной жидкости является вспомогательным фактором для выявления метастазов в брюшной полости, так как создается анэхогенное акустическое окно, на фоне которого отчетливо дифференцируются метастатические очаги, схожие по эхогенности с окружающими органами и тканями (рис. 2) [14–16]. Не вызывает трудностей и визуализация метастазов в большой сальник на фоне асцита,

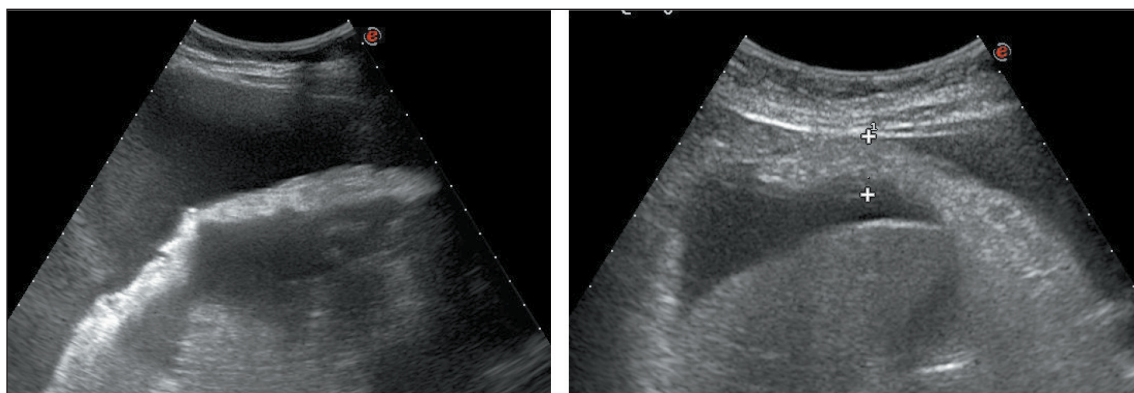


Рис. 3. УЗИ брюшной полости. На фоне асцита определяется утолщенный до 2,5 см гиперэхогенный большой сальник, неоднородной структуры и с бугристыми контурами. Применение оптимизированной методики УЗИ путем сканирования конвексным датчиком в положении пациентки стоя, что вызывает приток свободной жидкости к передней брюшной стенке, метастатически измененный сальник достаточно четко дифференцируется на фоне асцитической жидкости [17]

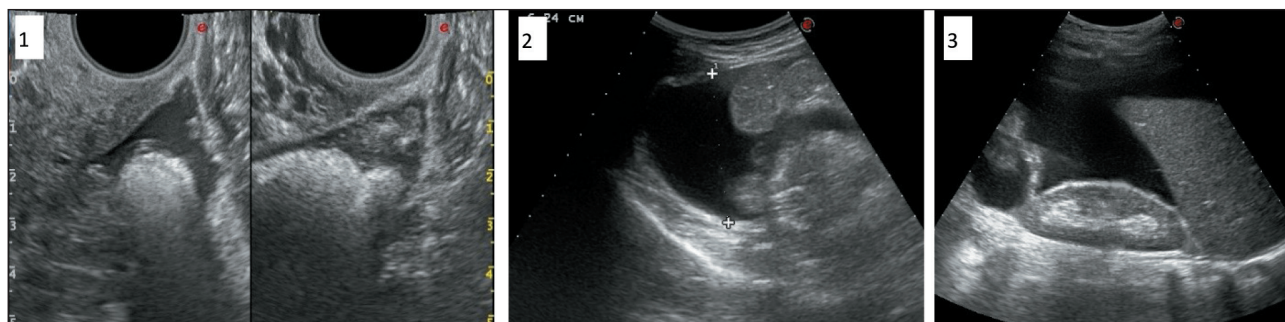


Рис. 4. Эхографическая визуализация асцита различной степени выраженности. 1. Минимальное количество АЖ (100–300 мл), при трансвагинальном УЗИ определяется анэхогенная прослойка свободной жидкости в позадидиматочном пространстве (80–100 мл), кпереди от матки, паравариально, между петлями кишечника в нижнем этаже брюшной полости (более 100 мл). 2. Умеренное количество АЖ (300–1000 мл), при трансвагинальном УЗИ – свободная жидкость в тех же анатомических областях, но в большем количестве. При сканировании конвексным датчиком в положении лёжа анэхогенные зоны определяются в боковых каналах брюшной полости и межпечельно. 3. Большое количество АЖ (1000 мл и более), при трансабдоминальном УЗИ конвексным датчиком в положении лёжа – анэхогенная зона достигает передней брюшной стенки, заполняет пространство между париетальной брюшиной, большим сальником и петлями кишечника, подпечёночного пространства [17]

Таблица

Результаты клинических и параклинических методов исследования при асците [6]

Методы	Частота
Клиническое обследование	Притупление перкуторного звука, симптом «волны», которые определяются при наличии >1500 мл АЖ. Чувствительность диагностики – 50–94 %
Симптомы	Анорексия (36 %), тошнота (37 %), вздутие живота (55 %), боли в брюшной полости (53 %), изменение веса (5 %), одышка (11 %), рвота (25 %) и усталость (17 %)
Лучевая диагностика	УЗИ позволяет определить асцит объемом от 100 мл жидкости, СКТ и МРТ – от 20 мл АЖ. Методы позволяют определить распространенность процесса, но не всегда дифференцировать злокачественный и доброкачественный процесс
Цитологическое исследование	Стандартная методика для диагностики злокачественного асцита. Позволяет дифференцировать злокачественную, инфекционную и воспалительную природу асцита (чувствительность – 97 %). Клеточный компонент АЖ представлен клетками мезотелия, опухолевыми клетками, клетками гемопоэтического происхождения. Эффективность цитологии выше при первичном раке брюшины
Иммуноцитохимическое исследование	Методика важна для определения локализации опухоли: СА–125 – экспрессируется при РЯ. Также при ИГХ определяют и другие маркеры: рецепторы эстрогена, цитокератин 7, цитокератин 20, рецепторы прогестерона, калретицин, раковоэмбриональный антиген, белок опухоли Вильмса (WT1), GCDFP-15 (gross cystic disease fluid protein) и TTF 1 (thyroid transcription factor 1)

играющего роль акустического окна (рис. 3). При минимальном количестве АЖ или ее отсутствии особые трудности связаны с выявлением метастазов размерами до 8–15 мм в брюшной полости. Эхографическая визуализация асцита различной выраженности представлена на рис. 4.

Исследование белка позволяет дифференцировать транссудат и экссудат: в транссудате содержание белка менее 25 г/л (цирроз печени, гипоальбуминемия), в экссудате – более 30 г/л (малигнизация, воспаление). Общепринятым для дифференциальной диагностики является подсчет градиента «сывороточный альбумин/альбумин асцитической жидкости» (SAAG), который позволяет предположить причину развития асцита, а также прогнозировать риск инфицирования АЖ. Важным показателем является клеточный состав асцитической жидкости и цитологическое исследование, направленное на выявление атипичных клеток (таблица).

Перитонеальная диссеминация и асцит при раке яичников, прогностическое значение

Перитонеальная диссеминация является одним из наиболее неблагоприятных факторов прогрессирования злокачественных опухолей. Однако прогностические факторы, связанные со злокачественным асцитом, изучены недостаточно. По мнению ряда авторов, наличие асцита в сочетании с отеками, низким уровнем белка в сыворотке крови, метастатическим поражением печени отражает наиболее неблагоприятное течение злокачественного процесса [18, 19]. Хотя данные параметры сами по себе могут свидетельствовать о большей запущенности заболевания и снижении компенсаторных резервов, имеются данные, подтверждающие независимое значение каждого из указанных параметров для прогноза, а также важное предиктивное значение концентрации белка в АЖ [19, 20].

Частота перитонеальной диссеминации при первичном РЯ с учетом поздней диагностики

достигает высоких значений и сопоставима с долей диагностирования запущенных форм, что, собственно, и отражается на эффективности хирургического и химиотерапевтического лечения. Однако многие исследователи утверждают, что наличие асцита при РЯ носит не столь фатальный характер в отношении показателей выживаемости, в сравнении с асцитными формами карцином других локализаций [19, 20], что, вероятно, связано с различиями в молекулярно-генетических характеристиках и спектрах чувствительности к химиотерапевтическим агентам опухолей различных локализаций. Так или иначе, наличие асцита при РЯ может указывать на наличие злокачественных клеток в брюшной полости и является серьезным прогностическим признаком [21, 22].

Степень выраженности канцероматоза при РЯ напрямую взаимосвязана с запущенностью заболевания и продукцией асцитической жидкости [23]. Подтверждена взаимосвязь между стадией РЯ и объемом асцитической жидкости [23]. По данным N. Lazarov et al., частота выявления злокачественного асцита при РЯ Ia стадии составляет 29 %, при РЯ Ic стадии достигает 59 % [24]. Возраст, стадия, степень дифференцировки опухоли и цитология являются важными прогностическими маркерами раннего РЯ и высокого риска рецидивирования [25]. В 2013 г. в когортном исследовании (n=215) получены важные результаты по выживаемости больных ранним РЯ, свидетельствующие, что наличие асцитической жидкости и её количество играют меньшее прогностическое значение, чем выявление опухолевых клеток в АЖ. Так, 78 % больных ранним РЯ с позитивной перитонеальной цитологией умерли в течение 12 лет, что было значимо выше, чем в группе больных с негативной цитологией, – 21 % (p=0,0027), 5-летняя выживаемость больных в группе с позитивной цитологией была значительно хуже, чем с негативной, – 79 и 33,3 % соответственно (p=0,0059) [24]. Поэтому оправдана концепция, что локализованной формой РЯ может быть названа лишь Ia стадия с ограничением процесса в пределах одного яичника, без поражения капсулы и при условии отсутствия опухолевых клеток в АЖ или перитонеальных смывах [26].

Подобные данные подтверждают ценность цитологического исследования жидкости и взятие смывов с брюшины в рамках выполнения хирургического стадирования. Прогноз пациенток с РЯ ранней стадии при несоблюдении указанных принципов и игнорировании данных цитологии становится намного более неблагоприятным, поскольку может повлечь неправильную лечебную тактику [27].

По некоторым данным, объем асцита сам по себе имеет прогностическое значение у больных с серозными низкодифференцированными карциномами яичников. Подобный вывод был сделан на основании сравнения молекулярных характе-

ристик АЖ у больных диссеминированным раком яичников с асцитом менее 200 мл и более 1000 мл. Наиболее убедительные результаты касались экспрессии генов иммунного ответа и уровня инфильтрации опухоли иммунными клетками: у больных с меньшим объемом АЖ наблюдалось увеличение данных параметров. В группе из 149 больных было также показано, что при асците небольшого объема получены лучшие хирургические результаты и более длительная общая выживаемость. Эти данные позволили авторам выделить пациенток с диссеминированными High-grade карциномами яичников и небольшим количеством асцита в прогностически более благоприятную субгруппу карцином, ассоциированную с up-регуляцией иммунных параметров [28].

Выводы о прогностическом значении объема асцитической жидкости при РЯ касаются именно диссеминированного High-grade серозного овариального рака. Исследование, проведенное T. Feigenberg et al., с рассмотрением сопоставимых по распространенности клинических случаев, предполагает оценку объема асцита не с позиций этапности опухолевой прогрессии, а в качестве рандомизирующего параметра клинического уровня, позволяющего выделить уникальную по своим иммунологическим характеристикам субгруппу малоасцитных овариальных карцином с более благоприятным клиническим прогнозом [28].

Компоненты асцитической жидкости при раке яичников

Все больше внимания уделяется не только позитивной перитонеальной цитологии, но и характеристике компонентов асцита [29]. В модели поведения опухоли при её диссеминации асциту придается большее значение. Опухолевые клетки в асците присутствуют либо как отдельные клетки, либо, чаще, как агрегаты клеток, обозначаемые как «сфероиды» [30, 31]: существующий сценарий событий интраперитонеальной диссеминации при РЯ заключается в непосредственном распространении опухоли дистально от первичного очага, вовлекая ряд процессов, в том числе клеточную пролиферацию, эпителиально-мезенхимальный переход (ЕМТ), результатом которого является миграция опухолевых клеток, и, наоборот, мезенхимально-эпителиальный переход (МЕТ), обеспечивающий колонизацию опухолевых клеток с формированием перитонеальных имплантов [32–34]. Для перитонеальной диссеминации РЯ также имеют значение спонтанные и ятрогенные разрывы капсулы опухоли. Формирование «сфероидов», представленных комплексами опухолевых клеток, приобретенных путем ЕМТ способность к миграции и путем МЕТ способность к редифференцировке и восстановлению тканевой структуры, в итоге приводит к формированию имплантов на поверхности соседних органов, а на более поздних стадиях и метастазов



Рис. 5. Основные типичные компоненты асцита при РЯ

в отдаленные органы [35]. При этом злокачественный асцит представляет собой уникальное микроокружение опухоли, обеспечивающее физический субстрат для накопления клеточного и бесклеточного компонентов (рис. 5).

На основании морфологического анализа показано, что из асцита можно выделить два различных типа клеток: клетки мезенхимального и эпителиального происхождения. Обе клеточные популяции по своим характеристикам напоминают стволовые/прогениторные клетки с высоким регенераторным/пролиферативным потенциалом, экспрессирующие типичные маркеры опухолевых стволовых клеток, включая CD44^{high}, CD24^{low} и AC133⁺. Эти клетки также характеризуются высоким уровнем экспрессии генов, связанных с онкогенезом и метастазированием, в том числе BMP-2, BMP4, TGF- β , EGFR и integrin $\alpha 2\beta 1$ [36].

Клеточный компонент асцита можно также подразделить на «резидентные клетки», такие как опухолевые и опухоль-ассоциированные фибробласты, или стромальные клетки и «нерезидентные клетки», такие как иммунные и мезенхимальные стволовые клетки. Каждая популяция клеток имеет определенную роль и связана друг с другом посредством сигнализации с помощью «внутренних» растворимых факторов [37]. Процессы ауто/паракринной коммуникации и реципрокных отношений между компонентами стромального опухолевого микроокружения, опухолевыми стволовыми клетками и растущими опухолевыми очагами индуцируют стромальный провоспалительный ответ, сопровождающийся образованием различных аутокринных и паракринных молекул (факторов роста, цитоки-

нов, хемокинов, матриксных протеаз, иммуносупрессоров), оказывающих потенцирующее действие на рост опухоли [38]. Бесклеточный компонент асцита обеспечивает взаимодействие клеточного компонента посредством растворимых факторов (цитокины, белки, метаболиты) и внеклеточных везикул (микровезикулы и экзосомы) [39].

В настоящее время среди растворимых высоко- и низкомолекулярных компонентов асцита ведется активный поиск дополнительных прогностических и предикторных факторов, позволяющих уточнить молекулярный фенотип и персонифицировать лечение больных РЯ [22, 29, 40]. Асцитические экзосомы и микровезикулы вследствие их высокой биологической активности также вовлечены в канцерогенез [41–43].

Заключение

Асцитическая жидкость представляет собой легкодоступный и ценный источник содержащегося в нем клеточного и внеклеточного компонентов, задействованных в овариальном канцерогенезе. Характеристика и динамика клеточного и молекулярно-генетического состава асцитической жидкости до лечения и на его этапах являются активно изучаемыми и перспективными направлениями. Изучение компонентов асцитической жидкости для расширения представлений о патогенезе, возможностях моделирования стратегий лечения и улучшения эффективности лечения диссеминированного РЯ представляется весьма целесообразным. Кроме того, изучение асцитической жидкости – важный инструмент в понимании механизмов индуцированной химиорезистентности.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Runyon B.A. Care of patients with ascites. N Engl J Med. 1994 Feb 3; 330 (5): 337–42. doi: 10.1056/NEJM199402033300508.
2. Runyon B.A., Hoefs J.C., Morgan T.R. Ascitic fluid analysis in malignancy-related ascites. Hepatology. 1988; 8: 1104–1109.
3. Jehn C.F., Küpferling S., Oskay-Özelik G., Lüftner D. A survey of treatment approaches of malignant ascites in Germany and Austria. Support Care Cancer. 2015 Jul; 23 (7): 2073–8. doi: 10.1007/s00520-014-2557-9.
4. Parsons S.L., Lang M.W., Steele R.J. Malignant ascites: a 2-year review from a teaching hospital. Eur. J. Surg. Oncol. 1996; 22: 237–239.

5. Smolle E., Taucher V., Haybaeck J. Malignant Ascites in Ovarian Cancer and the Role of Targeted Therapeutics. Anticancer Res. 2014 Apr; 34 (4): 1553–61.
6. Kipps E., Tan D.S.P., Kaye S.B. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. Nat Rev Cancer. 2013 Apr; 13 (4): 273–82. doi: 10.1038/nrc3432.
7. Starling E.H. On the absorption of fluids from the connective tissue spaces. J Physiol. 1896 May 5; 19 (4): 312–26.
8. Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that pro-

motes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983 Feb 25; 219 (4587): 983–5.

9. Степанов И.В., Падеров Ю.М., Афанасьев С.Г. Перитонеальный канцероматоз. Сибирский онкологический журнал. 2014; 5: 45–53. [Stepanov I.V., Paderov Yu.M., Afanasyev S.G. Peritoneal carcinomatosis. *Siberian Journal of Oncology*. 2014; 5: 45–53. (in Russian)].

10. *European Association for the Study of the Liver*. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol*. 2010 Sep; 53 (3): 397–417. doi: 10.1016/j.jhep.2010.05.004.

11. Ивашкин В.Т. Гастроэнтерология: национальное руководство. М., 2008. 704. [Ivashkin V.T. *Gastroenterology: National Guideline*. Moscow, 2008. 704. (in Russian)].

12. Ардатская М.Д. Асцит и перитонит в практике терапевта и гастроэнтеролога. *Consilium Medicum*. 2009; 11 (8): 51–60. [Ardatskaya M.D. Ascites and peritonitis in the practice of therapist and gastroenterologist. *Consilium Medicum*. 2009; 11 (8): 51–60. (in Russian)].

13. Inadomi J., Cello J.P., Koch J. Ultrasonographic determination of ascitic volume. *Hepatology*. 1996 Sep; 24 (3): 549–51. doi:10.1002/hep.510240314.

14. Болдогоева И.М., Берзин С.А. Современные возможности диагностики рака яичников в онкологическом диспансере. Екатеринбург, 2007: 34–52. [Boldogoyeva I.M., Berzin S.A. Modern possibilities of diagnosis of ovarian cancer in the oncologic dispensary. Yekaterinburg, 2007. 34–52. (in Russian)].

15. Ситникова М.Е., Чекалова М.А., Брюзгин В.В., Махова Е.Е. Место эхографии в уточнении подходов к лечению рака яичников. Опухоли женской репродуктивной системы. 2008; 4: 72–76. [Sinitnikova M.Ye., Chekalova M.A., Bryuzgin V.V., Makhova Ye.Ye. Place of echography in specifying approaches to treating ovarian cancer. *Tumors of female reproductive system*. 2008; 4: 72–76. (in Russian)].

16. Степанов С.О., Митина Л.А., Гуц О.В., Беспалов П.Д. Визуализация перитонеальной диссеминации при ультразвуковом исследовании. Лучевая диагностика и терапия. 2013; 3 (4): 66–70. [Stepanov S.O., Mitina L.A., Guts O.V., Bepalov P.D. Ultrasound imaging of peritoneal dissemination. *Diagnostic radiology and radiotherapy*. 2013; 3 (4): 66–70. (in Russian)].

17. Вяткина Н.В., Фролова И.Г., Коломиец Л.А., Молчанов С.В., Виллерт А.Б. Возможности комплексного ультразвукового исследования в дооперационном стадировании диссеминированного рака яичников. Сибирский онкологический журнал. 2016; 15 (4): 26–32. [Vyatkina N.V., Frolova I.G., Kolomiets L.A., Molchanov S.V., Villert A.B. Diagnostic value of ultrasound examination in preoperative staging of disseminated ovarian cancer. *Siberian journal of oncology*. 2016; 15 (4): 26–32. (in Russian)]. doi: 10.21294/1814-4861-2016-15-4-26-32.

18. Mackey J.R., Venner P.M. Malignant ascites: demographics, therapeutic efficacy and predictors of survival. *Can J Oncol* 1996; 6: 474–480.

19. Ayantunde A.A., Parsons S.L. Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Ann Oncol* 2007; 18: 945–949. doi: 10.1093/annonc/mdl499.

20. Garrison R.N., Kaelin L.D., Galloway R.H., Heuser L.S. Malignant ascites. Clinical and experimental observations. *Ann Surg* 1986; 203: 644–651.

21. Sangisetty S.L., Miner T.J. Malignant ascites: A review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures. *World J Gastrointest Surg* 2012 April 27; 4 (4): 87–95. doi: 10.4240/wjgs.v4.i4.87.

22. Szender J.B., Emmons T., Belliotti S., Dickson D., Khan A., Morrell K., Khan A.N.M.N., Singel K.L., Mayor P.C., Moysich K.B., Odunsi K., Segal B.H., Eng K.H. Impact of ascites volume on clinical outcomes in ovarian cancer: A cohort study. *Gynecol Oncol*. 2017 Sep; 146 (3): 491–497. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.06.008.

23. Tan D.S., Agarwal R., Kaye S.B. Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *Lancet Oncol* (2006) 7 (11): 939–1. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70939-1.

24. Lazarov N., Lazarov L., Lazarov S. Role of ascites and peritoneal cytology as prognostic factor for a patients with early epithelial ovarian cancer. *Trakia Journal of Sciences*. 2013; 11 (4): 359–361.

25. Chan J.K., Tian C., Monk B.J., Herzog T., Kapp D.S., Bell J., Young R.C.; *Gynecologic Oncology Group*. Prognostic factors for high-risk early-stage epithelial ovarian cancer. *Cancer*. 2008 May 15; 112 (10): 2202–10. doi: 10.1002/cncr.23390.

26. Kolomainen D.F., A'Hern R., Coxon F.Y., Fisher C., King D.M., Blake P.R., Barton D.P., Shepherd J.H., Kaye S.B., Gore M.E. Can patients with relapsed, previously untreated, stage I epithelial ovarian cancer be successfully treated with salvage therapy? *J Clin Oncol*. 2003; 21 (16): 3113–8. doi: 10.1200/JCO.2003.06.119.

27. Puls L.E., Duniho T., Hunter J.E., Kryscio R., Blackhurst D., Gallion H. The Prognostic Implication of Ascites in Advanced-Stage Ovarian Cancer. *Gynecol Oncol*. 1996 Apr; 61 (1): 109–12.

28. Feigenberg T., Clarke B., Virtanen C., Plotkin A., Letarte M., Rosen B., Bernardini M.Q., Kollara A., Brown T.J., Murphy K.J. Molecular profiling and clinical outcome of high-Grade serous ovarian cancer presenting with low-versus high-volume ascites. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 367103. doi: 10.1155/2014/367103.

29. Kim S., Kim B., Song Y. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Sci*. 2016 Sep; 107 (9): 1173–8. doi: 10.1111/cas.12987.

30. Latifi A., Lurwor R.B., Bilandzic M., Nazaretian S., Stenvers K., Pyman J., Zhu H., Thompson E.W., Quinn M.A., Findlay J.K., Ahmed N. Isolation and characterization of tumor cells from the ascites of ovarian cancer patients: molecular phenotype of chemoresistant ovarian tumors. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e46858. doi: 10.1371/journal.pone.0046858.

31. Shield K., Ackland M.L., Ahmed N., Rice G.E. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol*. 2009 Apr; 113 (1): 143–8. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.11.032.

32. Naora H., Montell D.J. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer*. 2005 May; 5 (5): 355–66. doi: 10.1038/nrc1611.

33. Ahmed N., Thompson E.W., Quinn M.A. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol*. 2007; 213 (3): 581–8. doi: 10.1002/jcp.21240.

34. Stanojevic Z., Rancic G., Radic S., Potic-Zecovic N., Dordevic B., Markovic M., Todorovska I. Pathogenesis of malignant ascites in ovarian cancer patients. *Arch Oncol* 2004; 12 (2): 115–8.

35. Shield K., Ackland M.L., Ahmed N., Rice G.E. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol*. 2009 Apr; 113 (1): 143–8. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.11.032.

36. Ho C.M., Chang S.F., Hsiao C.C., Chien T.Y., Shih D.T. Isolation and characterization of stromal progenitor cells from ascites of patients with epithelial ovarian adenocarcinoma. *J Biomed Sci*. 2012 Feb 14; 19: 23. doi: 10.1186/1423-0127-19-23.

37. Ahmed N., Stenvers K.L. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol*. 2013 Sep 25; 3: 256. doi: 10.3389/fonc.2013.00256.

38. Wintzell M., Hijerpe E., Avall Lundqvist E., Shoshan M. Protein markers of cancer-associated fibroblasts and tumor-initiating cells reveal subpopulations in freshly isolated ovarian cancer ascites. *BMC Cancer*. 2012 Aug 18; 12: 359. doi: 10.1186/1471-2407-12-359.

39. Guo L., Guo N. Exosomes: potent regulators of tumor malignancy and potential bio-tools in clinical application. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015 Sep; 95 (3): 346–58. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.04.002.

40. Halkia E., Chrelias G., Chrelias C., Esquivel J. Update on Ovarian Cancer Peritoneal Carcinomatosis Multimodal-Treatment Considerations. *Gastroenterol Res Pract*. 2018 Apr 5; 2018: 5284814. doi: 10.1155/2018/5284814.

41. Janagam C., Atla B. Study of ascitic fluid cytology in ovarian tumors. *Int J Res Med Sci*. 2017 Dec; 5 (12): 5227–31. doi: 10.18203/2320-6012.ijrms20175382.

42. Юнусова Н.В., Тамкович С.Н., Кондакова И.В. Экзосомы в различных биологических жидкостях: состав и функции. Молекулярная медицина. 2017; 15 (4): 14–22. [Yunusova N.V., Tamkovich S.N., Kondakova I.V. Exosomes from various biological fluids: pattern and function. *Molecular medicine*. 2017; 15 (4): 14–22. (in Russian)].

43. Yunusova N.V., Tamkovich S.N., Stakheeva M.N., Grigor'eva A.A., Somov A.K., Tugutova E.A., Kolomiets L.A., Molchanov S.V., Afanas'ev S.G., Kakurina G.V., Choinzonov E.L., Kondakova I.V. The characterization of exosomes from biological fluids of patients with different types of cancer. *AIP Conference Proceedings* 1882; 2017: 020080. doi: 10.1063/1.5001659.

Поступила/Received 29.03.18
Принята в печать/Accepted 28.07.18

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Виллерт Алиса Борисовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения онкогинекологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: avillert@yandex.ru. SPIN-код: 1975-0042. Researcher ID (WOS): J-3140-2017. Author ID (Scopus): 56626547700. ORCID: 0000-0002-2773-1917.

Коломиец Лариса Александровна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением онкогинекологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: kolomietsla@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 6316-1146. Researcher ID (WOS): C-8573-2012. Author ID (Scopus): 7004921120. ORCID: 0000-0002-6854-8940.

Юнусова Наталья Валерьевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: bochkarevanv@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 3513-1888. Researcher ID (WOS): C-9275-2012. Author ID (Scopus): 8354141400. ORCID: 0000-0003-4595-4177.

Иванова Анна Александровна, кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: ivanovaana@oncology.tomsk.ru.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы объявляют, что у них нет конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Alisa B. Villert, MD, PhD, Senior Researcher, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: avillert@yandex.ru. Researcher ID (WOS): J-3140-2017. Author ID (Scopus): 56626547700. ORCID: 0000-0002-2773-1917.

Larisa A. Kolomiets, MD, DSc, Professor, Head of Gynecological Oncology Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: kolomietsla@oncology.tomsk.ru. Researcher ID (WOS): C-8573-2012. Author ID (Scopus): 7004921120. ORCID: 0000-0002-6854-8940.

Natalia V. Yunusova, DSc, Leading Researcher, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: bochkarevanv@oncology.tomsk.ru. Researcher ID (WOS): C-9275-2012. Author ID (Scopus): 8354141400. ORCID: 0000-0003-4595-4177.

Anna A. Ivanova, MD, PhD, Clinical Diagnostic Laboratory, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: ivanovaana@oncology.tomsk.ru.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.