

*Л.Ю. Владимирова, Е.М. Непомнящая, Н.А. Подзорова, И.А. Новикова,
Е.П. Ульянова, Н.А. Абрамова*

Рекомбинантный фактор некроза опухоли-тимозин- α 1: влияние на эффективность неoadъювантной химиотерапии и неоангиогенез при раке молочной железы

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
г. Ростов-на-Дону

В статье освещены результаты опыта клинического применения нового отечественного препарата на основе рекомбинантного фактора некроза опухоли-тимозин- α 1 (ФНО-Т) в комбинации с режимами химиотерапии FАС и РА на неoadъювантном этапе лечения больных раком молочной железы IIВ-IIIВ стадии. В отличие от стандартного подкожного метода введения авторами было предложено применять рекомбинантный ФНО-Т перитуморально с целью максимального воздействия препарата непосредственно на зону опухоли, перитуморальную ткань. При перитуморальном введении рекомбинантного ФНО-Т по 200000 МЕ в 1-5 дни каждого курса лечения выявлено достоверное увеличение частоты объективных эффектов, в том числе за счет увеличения частоты полных регрессий. По данным морфологического исследования выявлено: увеличение числа наблюдений лечебного патоморфоза III-IV степени, снижение числа микрососудов в опухоли по сравнению с первичной опухолью.

Ключевые слова: рак молочной железы, рекомбинантный фактор некроза опухоли-тимозин- α 1, неoadъювантная химиотерапия, перитуморальное введение, патоморфоз, неоангиогенез

Введение

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения как России, так и большинства других стран мира рак молочной железы (РМЖ) занимает лидирующую позицию. С 2002 по 2012 год заболеваемость РМЖ в Российской Федерации выросла на 21,6% с 60,22 до 76,74 случаев на 100 тыс. населения [5]. В России 24,3% всех случаев впервые диагностированного РМЖ составляют местно-распространенные формы, когда выполнение радикальной операции невозможно без предварительного системного лечения, позволяющего уменьшить размеры опухоли [1,16].

Одним из современных направлений развития онкологии является изучение роли цитокиновых препаратов в лечении злокачественных новообразований, в том числе рака молочной железы [11]. Сочетание химиотерапии (ХТ) с иммуностропными веществами может значительно снижать токсический и иммуносупрессивный эффект цитостатиков [2]. В этом аспекте представляет интерес рекомбинантный фактор некроза опухоли-тимозин- α 1 (ФНО-Т), который представляет собой гибридную молекулу двух биологически активных агентов – цитокина фактора некроза опухоли и гормона тимозина. Препарат обладает прямым противоопухолевым действием *in vitro* и *in vivo* на различных линиях опухолевых клеток; угнетает ангиогенез в противоположность ФНО- α , сохраняя при этом способность повышать проницаемость эндотелия сосудов; запускает процесс апоптоза опухолевых клеток; а также активирует каскад химических реакций коагуляционной системы крови [17]. Показана возможность усиления противоопухолевой эффективности цитостатиков при проведении комплексной терапии с фактором некроза опухоли- α (ФНО- α) [14]. Благодаря входящему в состав ФНО-Т тимозину- α 1 препарат способен оказывать стимулирующее воздействие на Т-клеточное звено иммунной системы, наиболее значимое для противоопухолевого иммунитета, а также участвует в реакциях гуморального иммунитета [17]. Обычно препарат вводится подкожно.

Несомненна важность неоангиогенеза в развитии раковых опухолей. Экспрессия фактора роста эндотелия сосудов в злокачественных опухолях молочной железы связана с неблагоприятным прогнозом [3], а подавление ангиогенеза ведет к торможению опухолевого роста и развития метастазов. Включение ФНО-Т в схему лекарственной терапии местно-распространенного рака молочной железы способно повлиять на эффективность лечения благодаря вышеописанным биологическим эффектам.

Известно, что развитие и рост злокачественной опухоли осуществляются при непо-

средственной ее способности продуцировать ангиогенные факторы, стимулирующие неоваскуляризацию [7]. По результатам некоторых исследований были получены морфологические доказательства эффективности применения аутобиотерапии (аутогемо- и аутоплазмохимиотерапии) с помощью определения микрососудистой плотности в раковых опухолях молочных желез [9,8]. В настоящее время представляет интерес изучение новых препаратов, способных влиять на неоангиогенез в опухоли.

Проанализировав механизмы действия ФНО-Т, мы предположили, что перитуморальное введение позволит получить более выраженный эффект за счет воздействия непосредственно на зону опухоли, местный иммунитет и неоангиогенез [12].

Материалы и методы

Основными критериями включения больных в исследование были: гистологически верифицированный РМЖ, степень распространения онкологического процесса T1-4N0-2M0, удовлетворительная функция печени, почек, костного мозга, отсутствие отдаленных метастазов, ECOG ≤ 1, возраст старше 18 лет. В исследование было включено 82 больных в возрасте от 29 до 69 лет; средний возраст 53,3 ± 1,1 лет. По возрасту, степени распространения заболевания, спектру сопутствующей патологии, гистологическому и молекулярно-биологическому типу больные существенно не различались. У 41,8% больных менструальная функция была сохранена, 61,2% больных были в менопаузе. Известно, что у молодых женщин злокачественная опухоль развивается на иной клеточной базе по сравнению с больными старших возрастных групп, в большем проценте случаев из клеток базального типа, имеющих предрасположенность к прогенотоксическому варианту гормонального канцерогенеза и чаще эстроген-рецептор негативных, что может служить одной из причин более стремительного развития заболевания и требует других подходов к терапии [6,15]. Люминальный В (HER2+/-) тип РМЖ наблюдался в 61,6% случаев, HER2-гиперэкспрессирующий тип в 24,8%, тройной негативный и люминальный А типы РМЖ - по 9,8%.

Пациентки были рандомизированы в 2 группы: основную и контрольную. В основную группу вошли 30 пациенток, которым ФНО-Т вводили перитуморально по 200000 МЕ в 1 сутки (за 30 минут до введения цитостатиков) и далее 1 раз в день во 2 – 5 сутки каждого цикла ХТ. Для неоадьювантной ХТ в обеих группах применяли режимы FAC (5-фторурацил 500 мг/м² + доксорубин 50 мг/м² + циклофосфан 500 мг/м²; интервал 21 день) или PA (паклитаксел 175 мг/м² + доксорубин 50 мг/м²; интервал 21 день).

Непосредственный противоопухолевый эффект оценивали по критериям RECIST 1.0, побочные токсические эффекты ХТ оценивали согласно критериям СТС АЕ 3.0. Для оценки ангиогенеза в опухолях использовали индекс внутриопухолевой микрососудистой плотности (intratumor microvessel density - MVD), который позволяет количественно оценить процесс ангиогенеза в опухоли и определяется стандартным иммуногистохимическим методом с использованием эндотелиальных антител.

Микрососуды окрашивали антителами CD34, CD31, VEGF и EGFR. Количество сосудов определяли в каждом поле зрения препарата. CD34 является общим эндотелиальным маркером и дает информацию обо всех сосудах в ткани опухоли – предсуществующих и новообразованных [4].

CD31 – член семейства молекул адгезии поверхностных гликопротеинов, вовлеченный в межклеточные взаимодействия, процессы эмбриогенеза и развития тканей. Маркеры CD34 и CD31 традиционно используют для выявления именно кровеносных сосудов и оценки плотности этих сосудов в ткани [10]. Среди разнообразных специфических и неспецифических регуляторов ангиогенеза ведущая роль, безусловно, принадлежит VEGF (vascular endothelial growth factor) - фактору роста эндотелия сосудов, так как он стимулирует неоангиогенез в опухолях; участвует в поддержании микрососудистой сети опухоли, препятствуя апоптозу незрелых эндотелиоцитов и препятствует нормальному ответу на опухоль иммунной системы, подавляя созревание дендритных клеток. Для сравнения использовали гистологический материал, полученный при трепанбиопсии опухоли до лечения и операционный материал. Статистическая обработка полученных данных производилась с использованием пакета программ Statistica 10,0.

Результаты непосредственного противоопухолевого эффекта проводимой терапии отражены в табл. 1. Процент достижения объективного ответа в виде частичного и полного регресса опухоли и лимфоузлов был выше в основной группе – 80% против 71,7% в контрольной группе (p<0,05). Полный регресс опухоли в основной группе был достигнут в 2,2 раза чаще, чем в группе контроля (16,6% и 7,7% соответственно, p<0,05). У 5,8% пациенток в группе контроля на фоне неоадьювантного лечения было отмечено прогрессирование злокачественного процесса, что не позволило выполнить хирургическое вмешательство. Случаев прогрессирования заболевания в основной группе не наблюдалось.

Таблица 1.
Непосредственный противоопухолевый эффект неоадьювантного лечения больных основной и контрольной групп

Результаты лечения	Основная группа N=30		Контрольная группа N=52	
	Абсолютно	%	Абсолютно	%
Прогрессирование	0	0	3	5,8
Стабилизация	6	20	12	23,1
Частичная регрессия	19	63,4	33	63,4
Полная регрессия	5	16,6*	4	7,7
Частичная + полная регрессия	24	80*	37	71,7

Примечание: * - достоверные различия по сравнению с контролем (p<0,05)

Достоверных отличий по имеющимся осложнениям после проведенной химиотерапии в сравниваемых группах не выявлено. В основной и контрольной группе больных наблюдались побочные эффекты низкой и средней степени выраженности. Из клинически значимых осложнений были наиболее часто: нейтропения 2-3 степени – 18-20% курсов, анемия 1-2 степени – 4%, диспепсия 1-2 степени 26-27%, сенсорная полинейропатия 1-2 степени – 13-14% (при ХТ по схеме PA). Местная реакция на перитуморальное введение ФНО-Т возникала у всех боль-

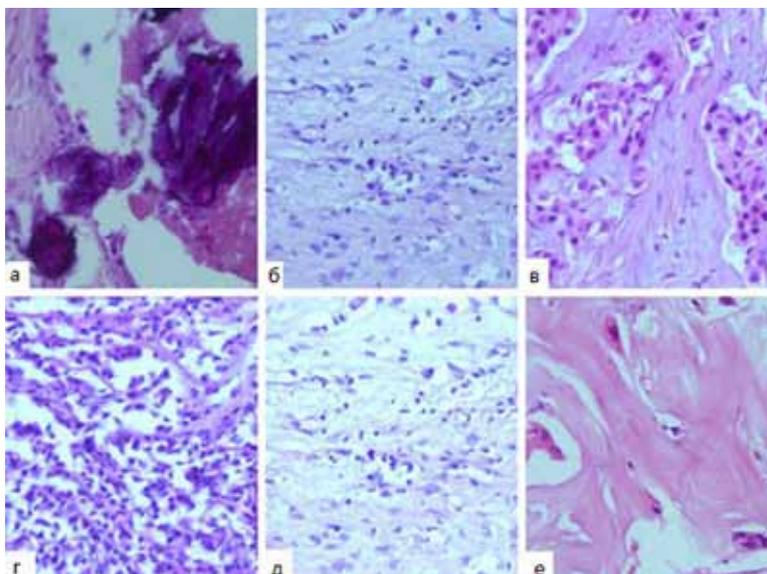


Рис. 1. Морфологические изменения в опухоли после применения рекомбинантного ФНО-Т: а) обширные поля петрификатов на фоне фиброзной ткани; б, д) очаговая лимфоплазмочитарная инфильтрация; в, г) дистрофические изменения раковых клеток; е) одиночные раковые клетки в фиброзной строме (окраска гематоксилином и эозином; х400)



Рис. 2. Степени терапевтического патоморфоза опухоли после курсов НАХТ в основной и контрольной группах больных



Рис. 3. Внутриопухолевая микросудейная плотность в трепан-биоптатах и в операционном материале больных основной и контрольной групп

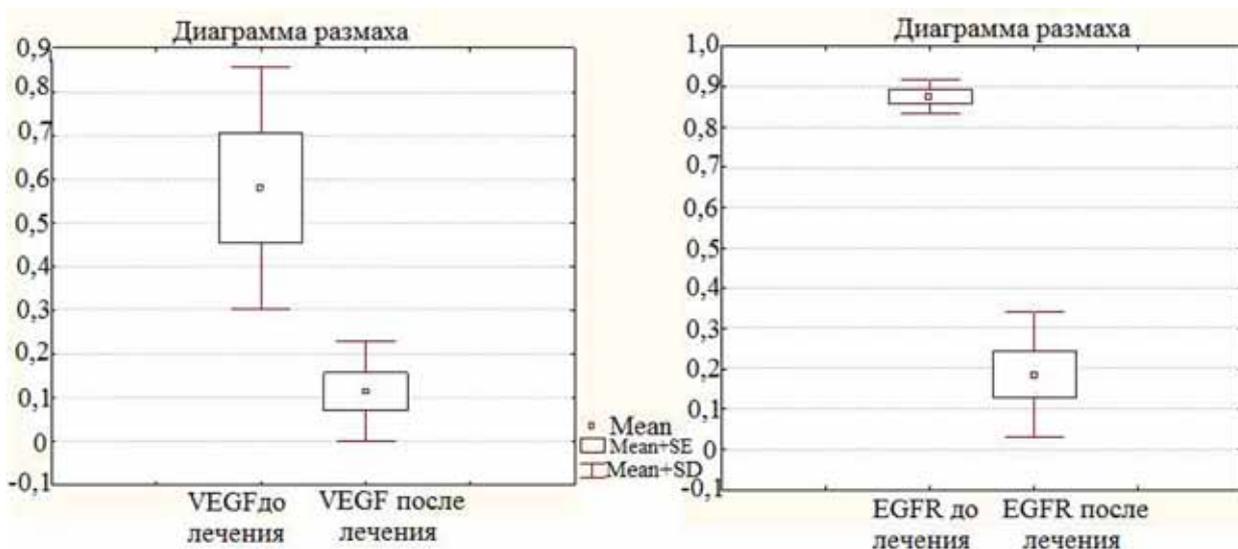


Рис. 4. Динамика VEGF, EGFR в трепан-биоптатах и в операционном материале больных основной группы на фоне проводимой терапии

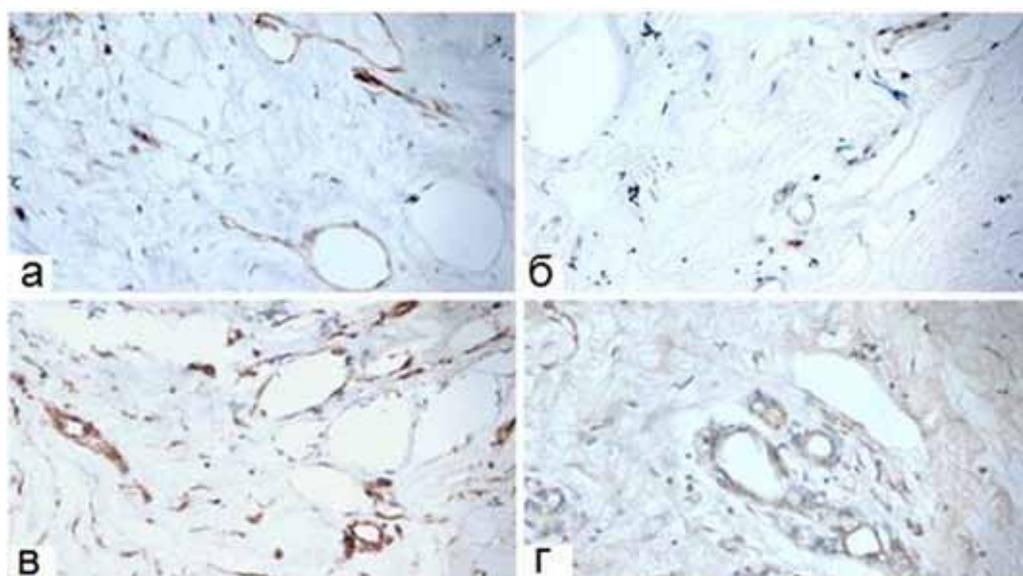


Рис. 5. Иммуногистохимические изменения в ткани опухоли молочной железы после 3-х циклов химиотерапии с рекомбинантным ФНО-Т (операционный материал) окрашивание на: а) CD34, б) CD31, в) EGFR, г) VEGF (x400)

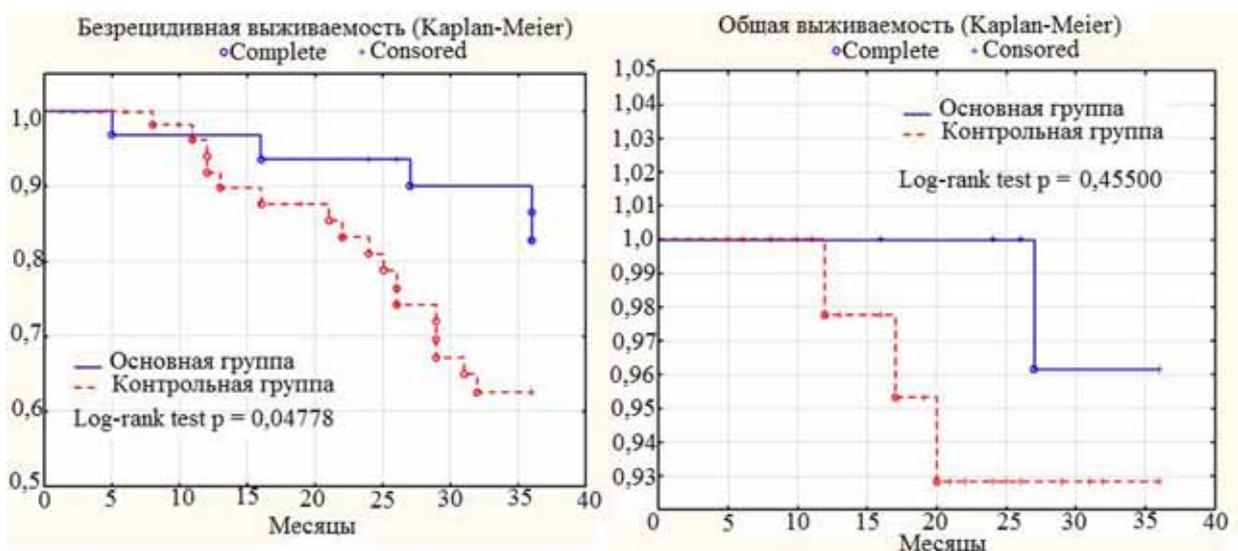


Рис. 6. Выживаемость больных исследуемых групп

ных основной группы через 6–12 часов в виде очага гиперемии 0–1 степени, слегка болезненного, без инфильтрации, а продолжительность ее варьировала от 24 до 48 часов. У 4 (16%) пациенток отмечалась гипертермия 1–2 степени через 6–12 часов после введения со снижением до нормальной температуры в течение 24 часов без применения жаропонижающих средств.

Морфологическое исследование опухолевой ткани и перитуморальной ткани больных основной группы показало, что в опухоли под действием ХТ в комбинации с перитуморальным введением рекомбинантного ФНО-Т были выявлены следующие изменения: выраженный фиброз стромального компонента опухоли: дистрофические, апоптотические и некробиотические процессы в раковых клетках; миксоматоз стромы. Встречали мелкие очаги некроза. По периферии опухоли иногда можно было видеть нерезко выраженную лимфоцитарную инфильтрацию (рис. 1).

Патоморфоз опухоли под действием цитостатиков является важнейшим показателем эффективности лечения. У больных с полным патоморфологическим эффектом были установлены статистически более высокие показатели 5-ти и 10-ти летней общей и безрегрессивной выживаемости [13]. Согласно классификации ВОЗ рака молочной железы 2012 года выделяют 4 степени лечебного патоморфоза рака молочной железы [18].

В основной группе больных с применением комбинации цитостатиков с иммунным препаратом отмечалось статистически достоверное увеличение числа наблюдений лечебного патоморфоза III–IV степени, по сравнению с контрольной группой: 10 (33,2%) и 9 (17,34%) случаев соответственно ($p < 0,05$), что представлено на рис. 2.

В основной группе больных с применением комбинации цитостатиков с рекомбинантным ФНО-Т отмечалось статистически значимое увеличение частоты наблюдений лечебного патоморфоза III–IV степени по сравнению с контрольной группой: 33,2% и 17,34% соответственно ($p < 0,05$).

После проведенной ХТ в сочетании с рекомбинантным ФНО-Т в ткани опухоли молочной железы было обнаружено, что микроциркуляторная плотность в поле зрения для CD31 снижалась с $5,9 \pm 0,34$ в трепан-биоптатах до $2,24 \pm 0,35$ в операционном материале ($p < 0,05$); для CD34: $6,88 \pm 1,07$ и $2,75 \pm 0,72$ соответственно ($p < 0,05$). В контрольной группе микрососудистая плотность составляла для CD31: $9,54 \pm 0,89$ в трепан-биоптатах и $5,1 \pm 0,59$ в операционном материале ($p < 0,05$); для CD34: $8,2 \pm 0,52$ в трепан-биоптатах и $4,08 \pm 0,41$ в операционном материале ($p < 0,05$) (рис. 3).

При морфологическом исследовании образцов тканей больных основной группы в трепан-биоптатах по сравнению с операционным материалом процент VEGF, EGFR был выше (табл. 2, рис. 4).

Таблица 2.
Уровень VEGF, EGFR в ткани опухоли больных основной и контрольной групп на фоне лечения

Группы больных	VEGF	EGFR
Основная группа (трепанбиопсия), n=10	0,62±0,11	0,87±0,13
Основная группа (операционный материал), n=10	0,11±0,07*	0,18±0,05*
Контрольная группа (трепан-биопсия), n=10	0,75±0,15	0,83±0,14
Контрольная группа (операционный материал), n=10	0,57±0,08	0,67±0,11

Примечание: * - различия достоверны по отношению к исходному уровню ($p < 0,05$)

На рис. 5 показано уменьшение плотности микрососудов в опухоли в динамике на фоне терапии комбинацией химиопрепаратов с ФНО-Т.

Все пациентки основной группы были прооперированы, послеоперационных осложнений, связанных с использованием рекомбинантного ФНО-Т, не отмечено. Медиана наблюдения в основной группе составила $35,6 \pm 1,2$ месяцев, в группе сравнения – $34,1 \pm 1,1$ месяцев. Медианы выживаемости в обеих группах не достигнуты. Тем не менее, имело место достоверное увеличение показателей 3-летней безрецидивной выживаемости (БРВ) на 20% (с 63% в контроле до 83% в основной группе при включении в схему лечения ФНО-Т), log-rank test $p = 0,0477$. В общей выживаемости существенных отличий между группами к настоящему времени не выявлено (рис. 6).

Закключение

Таким образом, результаты проведенного исследования отражают достоверное увеличение эффективности неoadьювантной лекарственной терапии больных РМЖ IIВ–IIIВ стадии при перитуморальном применении рекомбинантного ФНО-Т. Отмечено, что повышается частота достижения объективного противоопухолевого эффекта за счет увеличения случаев полного регресса опухоли. Препарат обладает удовлетворительной переносимостью, не влияет на частоту и степень выраженности системных побочных реакций, местные побочные реакции клинически незначимы и купируются самостоятельно. Применение данной методики позволяет сократить сроки предоперационной терапии, достигнуть увеличения числа наблюдений лечебного патоморфоза III–IV степени, увеличить 3-летнюю БРВ на 20%. Одним из возможных

механизмов подобного эффекта является угнетение ангиогенеза, проявляющегося в снижении числа микрососудов в опухоли.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксель Е.М. Заболеваемость и смертность от рака молочной железы в России // *Материалы большой конференции RUSSCO: Рак молочной железы.* – 2014. – С.35-38.
2. Владимирова Л.Ю., Златник Е.Ю. Опыт перитуморального применения рекомбинантного фактора некроза опухоли-тимозина- $\alpha 1$ при местно-распространенном раке молочной железы IIB-IIIВ стадии // *Фундаментальные исследования.* – 2014. – №7. – С. 921-926.
3. Гапеенко Е.В., Державец Л.А. Уровень опухолевых маркеров, факторов роста, регуляторов неопластического ангиогенеза у больных раком молочной железы // *Здравоохранение.* – 2011. – №4. – С. 31–33.
4. Должиков А.А., Чурноусов М.И. Ангиогенез в раке молочной железы: клинико-морфологические и прогностические аспекты // *Человек и его здоровье.* – 2010. – №4. – С.148–155.
5. Каприн, А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2013 году. - М.: ФГБУ «МНИОИ им П.А. Герцена» Минздрава России, 2014. – 235с.
6. Кит О.И., Франциянц Е.М., Бандовкина В.А. и др. Уровень половых гормонов и пролактина в ткани злокачественных опухолей молочной железы у больных разного возраста // *Фундаментальные исследования.* – 2013. – Т.3. – №7. – С. 560–564.
7. Кит О.И., Франциянц Е.М., Никипелова Е.А., Комарова Е.Ф. Некоторые показатели неопластического ангиогенеза в ткани образований прямой кишки различной морфологической структуры // *Российский онкологический журнал.* – 2015. - №2. – С.12–18.
8. Непомнящая Е.М., Моисеенко Т.И. К морфологическому обоснованию неoadъювантной химиотерапии злокачественных опухолей на естественных средах организма в различных модификациях // *Известия высших учебных заведений Северо-Кавказский регион. Естественные науки.* – 2004. – №1. – С. 92–97.
9. Непомнящая Е.М., Новикова И.А., Гудцова Т.А. Новые морфологические доказательства эффективности аутобиохимиотерапии рака молочной железы // *Известия высших учебных заведений. Проблемы патологической анатомии и онкологии. Северо-кавказский регион. Естественные науки.* – 2006. – С.22-25.
10. Нефедова Н.А., Орлова О.А., Данилова Н.В. Маркеры ангиогенеза при опухолевом росте // *Архив патологии.* – 2016. – Т.78. – №2. – С.55-62. – doi: 10.17116/patol201678255-62.
11. Платинский Л.В., Брюзгин В.В., Подистов Ю.И. Возможности иммунотерапии в онкологической практике // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2008. – Т.8. – №4. – С.86.
12. Рак молочной железы. : Морфологическая диагностика и генетика. / Под ред. Франка Г.А., Завалишиной

- Л.Э., Пожарисского К.М. - М.: Практическая медицина, 2014. – 176с.
13. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Манихас А.Г. Рак молочной железы.: Химиотерапия и таргетная терапия. - М.: МЕДпресс-инфор, 2012. – 360с.
14. Сысоева Г.М., Даниленко Е.Д., Гамалей С.Г., Батенева А.В. Противоопухолевые свойства композиционного препарата фактора некроза опухоли альфа с производными гематопорфирина // *Сибирский онкологический журнал.* – 2010. – №6. – С.36-41.
15. Тодоров С.С., Кит О.И., Босенко Е.С., и др. Морфо-иммуногистохимическая характеристика синхронного билатерального рака молочных желез // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2014. – Т.157. – №5. – С.663–666.
16. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные заболевания в России в 2011году (заболеваемость и смертность). – М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2013. – 250с.
17. Шмелёв В.А., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Рефнот. Рекомбинантный Фактор Некроза Опухолей-Тимозин- $\alpha 1$, препарат с низкой системной токсичностью для лечения онкологических заболеваний. – М.: Рефнот-Фарм, 2010. – 95с.
18. Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J. et al. WHO Classification of Tumors of the Breast. IARC. World health organization classification of tumors. – Lyon:WHO Press, 2012.

*L.Yu.Vladimirova, E.M.Nepomnyashchaya,
N.A.Podzorova, I.A.Novikova, E.P.Uliyanova,
N.A.Abramova*

Recombinant tumor necrosis factor-thymosin- $\alpha 1$: the impact on the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy and angiogenesis in breast cancer

Rostov Research Institute of Oncology,
Rostov-on-Don

The article covers the results of clinical application of a domestic drug based on recombinant tumor necrosis factor-alpha-thymosin-alpha1 (TNF-T) combined with chemotherapy FAC and PA during neoadjuvant treatment of patients with breast cancer IIB-IIIВ stage. In contrast to the standard subcutaneous application method, the authors proposed peritumoral administration of TNF-T to maximize the drug’s action directly on the tumor, peritumoral tissue. TNF-T 200000 IU peritumorally on days 1-5 of each treatment course showed significant increase in objective effect rate, including increase in frequency of complete regressions, and decrease in frequency and intensity of chemotherapy complications. Morphological examination revealed an increase rate of medical pathomorphosis grade III-IV, decreased number of microvessels in tumor in comparison with primary tumors

Key words: breast cancer, recombinant hybrid protein of tumor necrosis factor-alpha-thymosin-alpha1, neoadjuvant chemotherapy, peritumoral application, pathomorphosis, angiogenesis