

С.Д. Иванов, Л.И. Корытова, Е.В. Власова, И.В. Овчинников

Показатели жидкостной биопсии как предсказательные маркеры эффективности химиолучевой терапии больных раком поджелудочной железы

Российский научный центр радиологии и хирургических технологий Минздрава России, Санкт-Петербург

В исследование были включены больные раком поджелудочной железы (РПЖ) 4-й стадии M_{0-1} . Лучевая терапия (ЛТ) была выполнена до суммарной дозы 51 Гр (доза за фракцию — 3 Гр). В качестве химиотерапевтических препаратов вводили внутриа­териально гемцитабин, гемзар + карбоплатин или карбоплатин + этопозид + 5-фторурацил. Биомаркер радиочувствительности ДНК крови пациентов был определен *ex vivo* до начала лечения в течение 4 ч с использованием флуоресцентной индикации. Выявление взаимосвязи изменений величин биохимического показателя с продолжительностью жизни больных свидетельствует о том, что показатель радиочувствительности ДНК крови способен персонифицировано предсказать результат более успешного лечения больных РПЖ после применения указанных схем химиолучевой терапии (ХЛТ).

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, химиолучевая терапия, радиочувствительность ДНК крови, предикция эффективности лечения

Рак поджелудочной железы (РПЖ) представляет собой заболевание со сложной этиологией и участием как генетических, так и экологических факторов [24]. Его развитию способствует табакокурение и систематическое употребление алкоголя, а также ожирение и сахарный диабет [5]. Наибольшая частота РПЖ зарегистрирована в развитых странах (например, в Сингапуре — до 12,5 случаев, в США — до 11 случаев, Финляндии — 10 случаев на 100 тыс. населения), отличающихся высокими социально-экономическими показателями. В Индии частота распространения этого заболевания составляет 2,2 случая на 100 тыс. человек. В России в 2014 г. величина стандартизованного показателя возникновения РПЖ составила 6,5 случаев на 100 тыс. человек при среднегодовом темпе прироста с 2004 г. — 0,87% [4]. Наиболее распространенной формой РПЖ является аденокарцинома, которая образуется из эпителиальных клеток протоков. В 65-67% случаев опухоль локализуется

в головке железы, в 30–33% — в теле и хвосте [5, 6].

Прогноз для больных РПЖ в целом неблагоприятный — эта локализация опухоли является 4-й ведущей причиной смерти онкологических больных США [22]. Медиана выживаемости для мужчин и для женщин составляет менее 1 года, в том числе для больных 4 стадии — около 8 месяцев [7, 26]. Симптоматика заболевания на этой стадии ярко выраженная: больные испытывают сильные боли, локализация и характер которых зависит от местонахождения вторичных злокачественных очагов. Продолжительность жизни при РПЖ продвинутых стадий зависит от распространенности метастазов, от того насколько выражена степень интоксикации, а также от успешности примененной схемы лечения и особенностей реакции организма на проведенную химио- (ХТ) и лучевую терапию (ЛТ).

В ряде публикаций была показана возможность использования крови в качестве материала для жидкостной биопсии при определении таких биомаркеров как циркулирующие опухолевые клетки, внеклеточные нуклеиновые кислоты и гемоглобин при выборе эффективной тактики лечения больных РПЖ [6, 8, 11, 15, 27]. Однако кроме недостаточной чувствительности этих маркеров как предиктивных, существующие технологии их оценки окончательно пока не приняты в клинике, так как они еще не соответствуют требованиям практической медицины по критериям длительности и трудоемкости [12].

Задачей настоящей работы явилось выявление значимости уровня радиочувствительности ДНК крови как показателя индивидуального предсказания эффективности планируемой ХЛТ для больных РПЖ.

Материалы и методы

В исследование было включено 9 больных с морфологической верификацией диагноза — протоковой аденокарциномой головки и тела поджелудочной железы ($T_4N_{x-1}M_{0-1}$). Возраст больных составлял 45 — 70 лет: у мужчин в среднем — 60,8 года, у женщин — 54,4 года (табл. 1). Все пациенты получали ХЛТ в период 2013 — 2015 гг в клинике РНЦРХТ МЗ РФ. В качестве химиотерапевтических препаратов вводили внутриа­териально гемцитабин

Результаты и обсуждение

(1000 мг/м²), гемзар (1000 мг/м²) + карбоплатин (450 мг/м²), или карбоплатин (300 мг/м²) + этопозид (100 мг/м²) + 5-ФУ (3.0 г/м²). ЛТ была выполнена на линейном ускорителе электронов "Ахсесс" с энергией квантов 6 Мэв с дозой за фракцию 3.0 Гр до суммарной физической дозы 51 Гр.

Определение общеизвестных цитологических и биохимических показателей крови осуществляли с использованием стандартных методик на анализаторах "Sysmex XT-2000" (Roche, США) и "ARCHITECT plus c4000" (Abbot, США), соответственно.

Радиочувствительность ДНК проб крови ex vivo в виде величины S-индекса была определена у пациентов до начала лечения согласно методике, основанной на измерении радиочувствительности всех ДНК-содержащих клеток крови и ДНК плазмы с использованием 4', 6-диамино-2-фенилиндола, в соответствии с патентом [3]. Общее время определения показателя составляет 4 ч.

Оценка продолжительности жизни пациентов была осуществлена индивидуально, начиная от даты проведения биохимического анализа до регистрации времени смертельного исхода больного.

Таблица 1. Характеристика больных раком поджелудочной железы IV стадии и режимов терапии в исследуемых группах

Параметр в группах больных	Группа мужчин	Группа женщин
Число больных	4	5
Средний возраст, годы (границы диапазона)	60,8±5,0 (49 — 70)	54,4±3,3 (45 — 65)
Статус лимфатических узлов N x N 1	3 1	5 0
Метастазы M x M 0 M 1	1 2 1	0 3 2
Лучевая терапия, дозы облучения (Гр)	3 Гр x 17 фракций = 51 Гр	3 Гр x 17 фракций = 51 Гр
Химиотерапия	гемцитабин	гемцитабин, гемзар + карбоплатин, карбоплатин + этопозид + 5-ФУ

Статистическая обработка результатов была проведена с помощью непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни и критерия Стьюдента. Полученные данные представлены в виде M±m. Критерием уровня достоверности был принят порог P<0.05. Для выявления связи между величинами цитологических или биохимических параметров крови с отдаленными результатами лечения были использованы методы регрессионного анализа и вычисления коэффициента корреляции по Спирмену (R).

Таблица 2. Продолжительность жизни, цитологические и биохимические показатели крови в группах больных раком поджелудочной железы, различающихся по метастазированию

Группа (n – число больных)	Продолжительность жизни (месяцы)	Число лейкоцитов (x 10 ⁹ кл/л)	Отношение: нейтрофилы /лимфоциты	Гемоглобин (г/л)	Железо (мкМ/л)	S-индекс (отн. ед)
M _{0-x} (n = 6)	16,6 ± 3,0	4,72 ± 0,49	3,91 ± 0,56	125,5 ± 3,4	14,8 ± 3,0	2,13 ± 0,51
M ₁ (n = 3)	7,5* ± 1,5	6,56 ± 1,10	4,75 ± 1,70	109,7* ± 5,0	12,7 ± 4,8	0,29** ± 0,05

Примечание: знаками * и ** помечены величины в группе M₁, достоверно (p< 0.05 и p< 0.01, соответственно) отличающиеся от аналогичных показателей в группе M_{0-x}.

В группах больных 4-й стадии РПЖ, различающихся по степени метастазирования, были пациенты как с достоверно не отличающимися клинико-биохимическими показателями крови — общее число лейкоцитов, отношение числа нейтрофилов к числу лимфоцитов, концентрация железа, так и с различающимися параметрами — концентрация гемоглобина, величина S-индекса (табл. 2). В сравнении с подгруппой M_{0-x}, у больных с метастазами (M₁) было выявлено сокращение продолжительности жизни примерно в 2 раза, сниженная почти на 13 % концентрация гемоглобина (P<0.05) и значительно более низкий уровень радиочувствительности ДНК крови (P<0.01).

Изменения продолжительности жизни пациентов, леченных с помощью вышеперечисленных схем ХЛТ, были достоверно связаны только с определенными в крови вариациями величины S-индекса (рис. 1):

$$T_{\text{мес.}} = 8.65 + 2.02 \times S \text{ (отн.ед.) (R = 0.78)}$$

и концентрацией гемоглобина:

$$T_{\text{мес.}} = -17.34 + 0.25 \times \text{Hb (г/л)} \text{ (R = 0.88)}.$$

В то же время диапазон отличий в группах M_{0-x} и M₁ величин S-индекса был более значимым по сравнению с таковым в изменениях концентраций гемоглобина (см. табл. 2). Это позволяет полагать, что надежнее предсказывать различия в продолжительности жизни пациентов после примененных схем ХЛТ на основании величины показателя радиочувствительности ДНК крови при его пороговом значении 0.6 отн. ед., чем основываясь на уровне гемоглобина.

В свою очередь степень радиочувствительности ДНК крови была связана с уровнем гемоглобина: S (отн.ед.) = - 8.60 + 0.08 x Hb (г/л) (R = 0.71), а также с концентрацией железа в плазме: S (отн.ед.) = - 0.40 + 0.16 x Fe (мкМ/л) (R = 0.85).

Проведенные ранее ретроспективные исследования показали, что ни железо крови, ни гемовое железо не ассоциировались с риском возникновения РПЖ [17]. Полученные нами данные о содержании общего железа в сыворотке крови больных РПЖ 4-й стадии

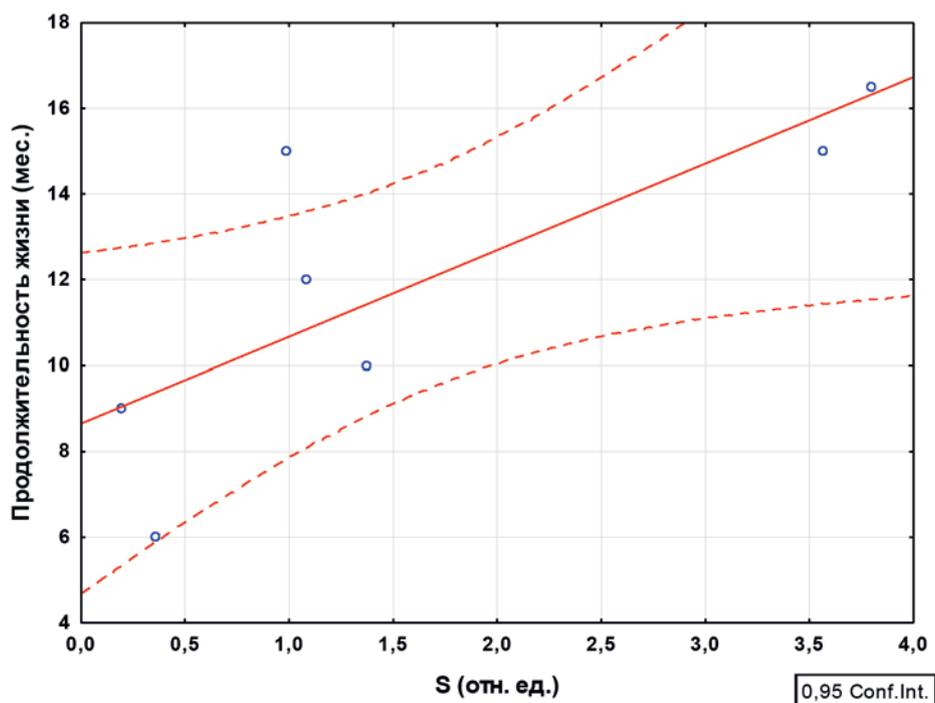


Рис. 1. Изменения продолжительности жизни больных РПЖ 4-й стадии, леченных с помощью ХЛТ, в связи с вариациями величин показателя радиочувствительности ДНК крови.
 По оси абсцисс — величина показателя радиочувствительности ДНК крови (S-индекс, отн. ед.); по оси ординат — продолжительность жизни пациентов после определения величины S-индекса (месяцы). Пунктиром показаны границы 95%-доверительного диапазона

согласуются с этим заключением и вместе с тем свидетельствуют о том, что возрастание концентрации гемоглобина, а также повышение концентрации сывороточного железа способствуют увеличению радиочувствительности ДНК крови и улучшению эффективности ХЛТ таких больных. Возможно, это является результатом подключения ферроптозной формы гибели облученных опухолевых клеток в дополнение к радиационному апоптозу [2].

В обследованных нами группах больных наблюдалась лишь тенденция к повышению показателя числа нейтрофилов к числу лимфоцитов примерно на 20% в случае метастазирования. Этот результат не противоречит опубликованным ранее данным о том, что нейтрофилия может быть индикатором прогрессии рака шейки матки [23] или рака молочной железы 1-2 стадии [19]. Однако этот параметр оказался недостоверным предсказательным показателем при продвинутых РПЖ 4-й стадии.

Хирургическое вмешательство является возможным выбором для макроскопически видимых новообразований, но при РПЖ большая часть больных выявляется на продвинутых стадиях, так как это заболевание развивается без определенных симптомов, локально инвазивно и метастазирует в отдаленные органы уже на своих начальных этапах [25]. При планировании в процессе лечения больных с РПЖ радикальной панкреатикодуоденэктомии и тотальной панкреатэктомии следует учитывать также возможность

таких осложнений как формирование анастомозов и развитие диабета. У больных, подвергшихся резекции РПЖ эффективна адъювантная ХТ с использованием 5-фторурацила (5-ФУ) и фолиновой кислоты [18]. ЛТ применялась преимущественно в качестве паллиативного подхода в лечении, особенно, для облегчения болей. Для дистанционного облучения требуются высокие дозы радиации (50–60 Гр). В качестве радиосенсибилизаторов ранее применяли 5-фторурацил (5-ФУ), но более успешным в сочетании с ЛТ оказалось применение гемцитабина [13, 21].

Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов, которые показали, что у 18 больных РПЖ 4-й стадии без метастазов (13 мужчин и 5 женщин), получивших трехмерную ЛТ в СОД 50,4–61,2 Гр, 1,8 Гр/фракцию и гемцитабин в дозе 1000 мг/м², медиана выживаемости составила 14,5 мес. [13]. В случае неоперабельного местно-распространенного РПЖ при ХЛТ, включающей СОД 45–50 Гр за 25–28 фракций с применением гемцитабина, продолжительность выживаемости таких больных была достаточно гетерогенна (границы величин этого параметра определялись в диапазоне от 5 до 66 мес.), а её медиана составляла 17 мес. [10]. Медиана выживаемости проанализированной нами и пролеченной когорты больных РПЖ составила 14,4±2,7 мес., что сопоставимо с таковой у вышеупомянутых зарубежных авторов. Вместе с тем, осуществленное нами определение величины S-индекса позволило предсказать индиви-

дуально успешность ХЛТ: у больных, имевших величину этого показателя выше 0.9, продолжительность жизни была 16.6 ± 3.0 месяцев, тогда как пациенты с S-индексом ниже 0.9 прожили значительно меньше — 7.5 ± 1.5 месяца ($P < 0.05$).

Несмотря на многолетние и многочисленные разработки лекарственных препаратов, которые способны подавлять активность онкогенных белков, определить гибель или затормозить деление злокачественных клеток, решение проблемы осуществить таргетную терапию в соответствии с генетическими характеристиками конкретных опухолей оказалось более сложным, чем ожидалось. Существующая парадигма основана на бинарной корреляции между мутированным геном (или набором генов) рака и реакцией на данную терапию. Однако имеются также данные, свидетельствующие о том, что не только мутации в различных кодонах исследуемых генов, но и другие изменения (в том числе, эпигенетические, микроокружение клеток, нарушения метаболизма и другие) могут быть связаны с вариациями чувствительности к так называемым «таргетным» терапиям [1, 16]. Примером является дивергентная реакция при мутациях EGFR, PIK3CA и KRAS в ответ на введение лекарственных средств. По-видимому, идея о том, что наличие специфической мутации модифицирует чувствительность или резистентность к определенному лекарственному препарату, слишком упрощена, поскольку она не отражает всей сложности сигнальных путей в конкретном новообразовании. Скорее всего, лишь общая картина генома с учётом индивидуального микроокружения, в конечном счете, определяют реакцию клеток конкретных опухолей на подведенную терапию.

В ряде проведенных исследований предлагается предсказывать успешность терапии на основании анализа в пробе жидкостной биопсии числа циркулирующих опухолевых клеток [20], что может определяться, в частности, метастазированием у больных РПЖ. Вместе с тем установление метастазирования достаточно сложная (включающая методы лучевой диагностики [9]) и длительная процедура, в сравнении с более кратким определением величины S-индекса, что важно для клинической практики. Кроме того, нам представляется, что для предсказания эффективности планируемой тактики ХЛТ важно не просто установить количество циркулирующих опухолевых клеток, но и выяснить возможность их гибели в результате тестирования вне организма предполагаемого терапевтического воздействия, на основании чего будет осуществляться персональная предикция успешности такой схемы лечения. Это позволит путем анализа пробы крови без воздействия на организм боль-

ного и в более ранние сроки осуществить научно обоснованное персонализированное предсказание планируемого лечения, так как своевременные биохимические измерения предшествуют цитологической и метастатической манифестации процессов, происходящих при РПЖ [24].

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов С.Д. Предиктивные биохимические маркеры ответа на лучевую и химиолучевую терапию онкологических больных // Биомед. химия. — 2012. — Т. 58. — Вып. 6. — С. 635-650.
2. Иванов С.Д. Железо и рак: роль ионов железа в процессе канцерогенеза и при лучевой терапии опухоленосителей // Усп. соврем. биол. — 2013. — Т. 133. — № 5. — С. 581-594.
3. Иванов С.Д., Ямшанов В.А., Маслюкова Е.А. Способ определения показаний к проведению органосохраняющего лечения больных раком мочевого пузыря / Пат. на изобр. № 2319963. Бюл. № 8 от 20.03.2008 г.
4. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Под ред. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность). — М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. — 250 с.
5. Соухами Р., Тобайас Дж. Рак и его лечение: пер. с англ. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. — 437 с.
6. Alix-Panabieres C., Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer // Clin. Chem. — 2013. — Vol. 59. — P. 110-118.
7. Andren-Sandberg A. Pancreatic cancer: chemotherapy and radiotherapy // North Am. J. Med. Sci. — 2011. — Vol. 3. — № 1. — P. 1-12.
8. Crowley E., Di Nicolantonio F., Loupakis F., Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood // Nat. Rev. Clin. Oncol. — 2013. — Vol. 10. — P. 472-484.
9. Ducreux M., Cuhna A.S., Caramella C. et al. Cancer of pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // Ann. Oncol. — 2015. — Vol. 26. — Suppl.5. — P.v56-v68.
10. Gillmore R., Lawrence V., Raouf S. et al. Chemoradiotherapy with or without induction chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer: a UK multi-institutional experience. // Clin. Oncol. — 2010. — Vol. 22. — P. 564-569.
11. Imamura T., Komatsu S., Ichikawa D. et al. Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: circulating tumor cells and cell-free nucleic acids // World J. Gastroenterol. — 2016. — Vol. 22. — № 25. — P. 5627-5641.
12. Lewis A.R., Valle J.W., McNamara M.G. Pancreatic cancer: Are "liquid biopsies" ready for prime-time? // World J. Gastroenterol. — 2016. — Vol. 32. — № 32. — P. 7175-7185.
13. Li C.-P., Chao Y., Chi K.-H. et al. Concurrent chemoradiotherapy treatment of locally advanced pancreatic cancer: gemcitabine versus 5-fluorouracil, a randomized controlled study // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. — 2003. — Vol. 57. — № 1. — P. 98-104.
14. Li D., Abbruzzese J.L. New strategies in pancreatic cancer: emerging epidemiologic and therapeutic concepts // Clin. Cancer Res. — 2010. — Vol. 16. — P. 4313-4318.
15. Li G., Huang Y., Manjunath Y. et al. Clinical significance of circulating tumor cells in pancreatic cancer // Biol. Med. (Aligarh). — 2016. — Vol. 8. — № 7. — P. 357-361.

16. Martini M., Vecchione L., Siena S. et al. Targeted therapies: how personal should we go? // *Nature Rev. Clin. Oncol.* — 2012. — Vol. 9. — P. 87-97.
17. Molina-Montes E., Wark P.A., Sanches M.J. et al. Dietary intake of iron, heme-iron and magnesium and pancreatic cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition cohort // *Int. J. Cancer.* — 2012. — Vol. 131. — № 7. — P. 47.
18. Neoptolemos J.P., Stocken D.D., Friess H. et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 350. — P. 1200-1210.
19. Orditura M., Galizia G., Diana A. et al. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) for prediction of distant metastasis-free survival (DMFS) in early breast cancer: a propensity score-matched analysis // *ESMO Open.* — 2016. — Vol. 1. — P. e000038.
20. Park E.S., Jin C., Guo Q. et al. Continuous flow deformability-based separation of circulating tumor cells using microfluidic ratchets // *Small.* — 2016. — Vol. 12. — № 14. — P. 1909-1919.
21. Shibuya K., Oya N., Fujii T. et al. Phase II study of radiation therapy combined with weekly low-dose gemcitabine for locally advanced, unresectable pancreatic cancer // *Am. J. Clin. Oncol.* — 2011. — Vol. 34. — № 2. — P. 115-119.
22. Siegel R., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics // *CA Cancer J. Clin.* — 2016. — Vol. 66. — P. 7-30.
23. Tavares-Murta B.M., Mendonca M.A.O., Duarte N.L. et al. Systemic leukocyte alterations are associated with invasive uterine cervical cancer // *Int. J. Gynecol. Cancer.* — 2010. — Vol. 20. — № 7. — P. 1154-1159.
24. Tuveson D.A., Neoptolemos J.P. Unraveling metastasis in pancreatic cancer: A call for new clinical approaches // *Cell.* — 2012. — Vol. 20. — P. 21-23.
25. Werner J., Combs S.E., Springfield C. et al. Advanced-stage pancreatic cancer: therapy options // *Nature Rev. Clin. Oncol.* — 2013. — Vol. 10. — P. 323-333.
26. Wolfgang C.I., Herman J.M., Laheru D.A. et al. Recent progress in pancreatic cancer // *CA Cancer J. Clin.* — 2013. — Vol. 63. — P. 318-348.
27. Yu K.H., Ricigliano M., Hidalgo M. Pharmacogenomic modeling of circulating tumor and invasive cells for prediction of chemotherapy response in pancreatic cancer // *Clin. Cancer. Res.* — 2014. — Vol. 20. — P. 5281-5289.

*S.D. Ivanov, L.I. Korytova, E.V. Vlasova,
I.V. Ovchinnikov*

Liquid biopsy indexes as predictive markers of chemoradiotherapy efficacy in patients with pancreatic cancer

A.M. Granov Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies
St. Petersburg

Patients with stage IV of pancreatic cancer were locally irradiated by 51 Gy total dose (fraction dose was 3 Gy). Gemcitabine, gemzar + carboplatin, or carboplatin + etoposid + 5-fluorouracil were intraarterially administered as chemotherapy preparations. DNA radiosensitivity biomarkers in patient blood were determined before the treatment start. There was revealed interrelation between value of biochemical index and life span patient. The DNA blood radiosensitivity index determinations are enabled to predict personally the results more success treatment in patients with pancreatic cancer after the use of abovementioned regimens of chemoradiotherapy.

Key words: pancreatic cancer, chemoradiotherapy, blood DNA radiosensitivity, efficacy treatment prediction

Поступила в редакцию 05.05.2017 г.