

А.Н. Шутко, В.Ф. Мус

Прогноз продолжительности жизни при метастатическом немелкоклеточном раке легкого

ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А. М. Гранова» Минздрава России, Санкт-Петербург

У пациентов с метастатическим немелкоклеточным раком легкого ретроспективно сопоставлены индивидуальные параметры циркулирующих стволовых гемопоэтических клеток лимфоидного ряда, измеренные методом цитофлуорометрии до начала лечения, с индивидуальными продолжительностями жизни. Показана возможность прогноза результатов лечения с продолжительностью жизни <1 года со специфичностью и избирательностью, близкими к 100%.

Ключевые слова: рак легкого, гемопоэтические стволовые клетки, прогноз, продолжительность жизни

Введение

Индивидуальный прогноз результатов лечения особенно актуален при метастатическом немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) ввиду высокой вероятности того, что конвенциональное цитотоксическое лечение этой патологии может дать результат хуже паллиативной терапии или даже в ее отсутствие [1]. Сопоставление кривых выживания при разных стадиях НМРЛ с хорошо известным индексом Карновского показывает, что при его одинаковых значениях пациенты могут жить как несколько месяцев, так и несколько лет [18]. Параметр нейтрофильно-лимфоцитарного отношения (Н/Л) тоже не решает проблему индивидуального прогнозирования, так как пациенты с одинаковыми значениями Н/Л до терапии могут жить от 1 до 60 месяцев [6]. Согласно современным данным, состояние здоровья и уровень жизнеспособности организма может зависеть от морфообразующей (трофической) функции гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), которые мигрируют в различные ткани, включая злокачественные, и стимулируют пролиферацию, регенерацию и репарацию в них [2, 11, 14, 16]. В свете этого становятся легко объяснимыми низкий уровень допустимой при терапии лимфоцитопении ($0.5 \times 10^9/\text{л}$) и неизбежные «побочные» эффекты в нормальных тканях [7, 11]. Корреляции между темпом смертности онкологических больных и переменным содержанием ГСК в крови в процессе лечения были зарегистрированы ранее [10].

В данной работе исследованы CD 133+ГСК, CD34+ГСК, общая митотическая активность во фракции лимфоцитов крови (Мт) больных метастатическим НМРЛ перед началом лечения, и показатели посмертно сравнены с их индивидуальной продолжительностью жизни (ПЖ).

Методы

35 пациентов с НМРЛ (Т3, N2,3, M0) получали традиционную химиолучевую терапию после паллиативной хирургии в РНЦРХТ. Перед началом лечения у больных измеряли количественные и функциональные показатели ГСК крови. Фенотипы циркулирующих клеток в лимфоидной фракции крови оценивали с использованием стандартных протоколов иммунофенотипирования с флуоресценцией аллоцикоцианиновых (APC) -конъюгированных анти-CD133/2 моноклональных антител (МА) и изотиоцианата флуоресцеина (FITC) — конъюгированных анти-CD34 МА. Фазы клеточного цикла G0+ G1, S, и G2 +M (Мт), определяли согласно [9] с красителем Hoechst33342. Использовали проточный цитометр LSR Fortessa (Becton-Dickinson) с лазерами 640 нм, 480 нм и 355 нм. Репродуктивную активность лимфопоэза (РА) для каждого пациента рассчитывали по формуле: $РА = \%Мт \times \%CD\ 133ГСК$ во фракции лимфоцитов Лф. Графоаналитическое разделение больных с различным темпом смертности произведено путём аппроксимирования кривой выживаемости двух-экспоненциальной зависимостью в программе Excel:

$$St = A e^{-kt} + B e^{-\lambda t} + C \quad (1),$$

где: St — доля выживших пациентов в любой момент t в течение 10-летнего периода, t — месяцы после начала терапии, k и λ — постоянный (экспоненциальный) темп смертности в месяц, A и B — пропорции пациентов, которые умерли с темпом k или λ соответственно; C — пропорция переживших 10 лет; $A+B+C=1,0$

Кинетический и статистический анализ выявлял связь между Мт, CD133, CD34 и РА признаками у пациентов и их принадлежностью к подгруппам с темпом экспоненциальной смертности k или λ путем аппроксимаций обнаруживаемых зависимостей уравнениями Excel.

Использовали также точный критерий Фишера, t-тест Стьюдента, стандартную ошибку (m) среднего (M) и вероятность (p). Величину $p \leq 0,05$ принимали как статистически значимую.

Результаты

Анализ кривой выживаемости. Согласно уравнению 1 и рис. 1 всех пациентов удалось ретроспективно разделить только на две подгруппы: подгруппа A=0,58; MB=4,3 мес.; n=21 человек с высоким темпом смертности ($k=0,15$ в мес.) и

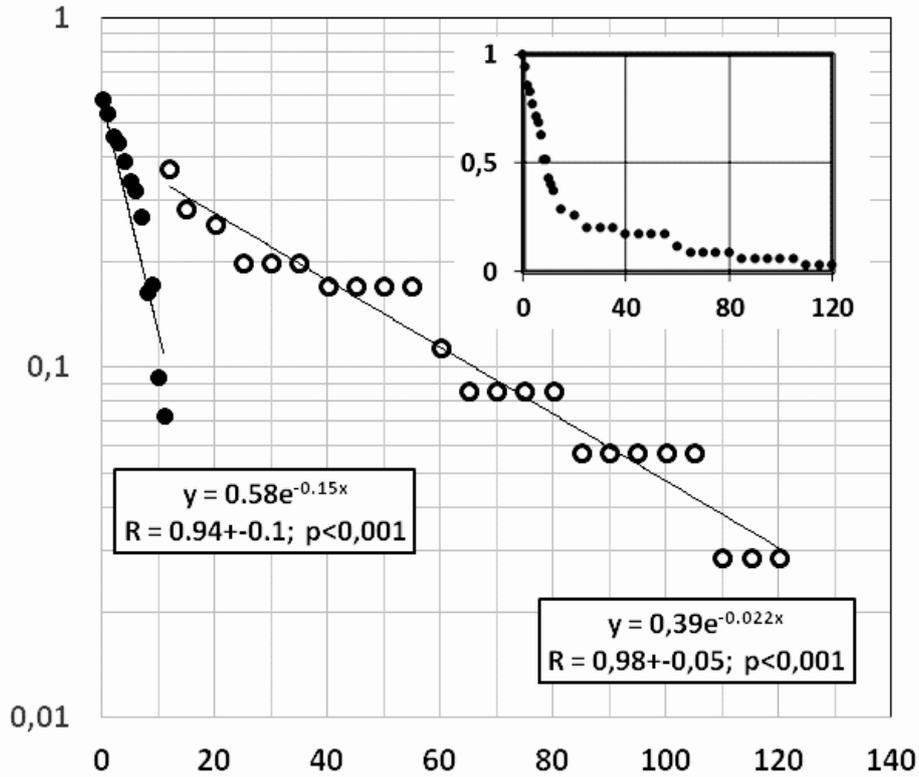


Рис. 1. Экспоненциальный анализ кривой выживаемости. Абсцисса: ПЖ, месяцы. Ордината: доля выживших, относительные единицы. Линейная форма кривой представлена в боксе сверху; уравнения экспонент в боксах внизу: слева - для подгруппы короткоживущих А (темп смертности 0,15 / месяц), справа - для подгруппы долго живущих В (темп смертности 0,022 / месяц)

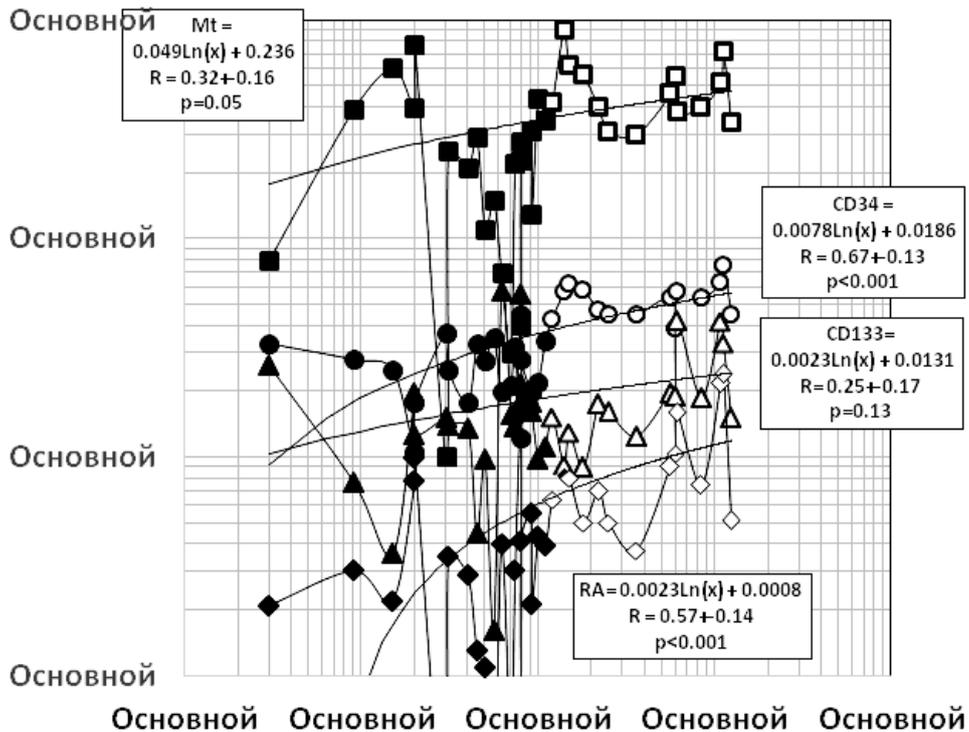


Рис. 2. Зависимость показателей от продолжительности жизни (ПЖ) Абсцисса: ПЖ, месяцы. Ордината: % во фракции лимфоцитов: митозы Мт (квадраты), CD34+ГСК (кружки), CD133+ГСК (треугольники); РА (ромбы). Черные значки - ПЖ < 12 мес.

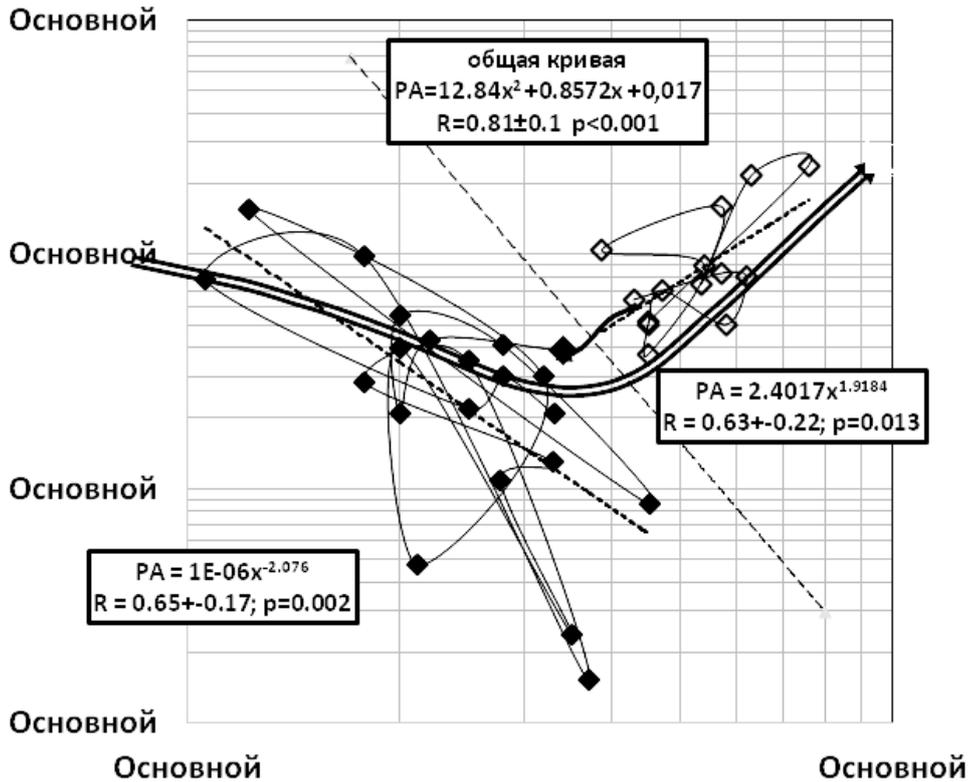


Рис. 3. Зависимость регенераторной активности PA (%Мт %CD 133) от величины CD34+ГСК. Абсцисса: % CD34+ГСК во фракции лимфоцитов; ордината: PA во фракции лимфоцитов. Черные значки—ПЖ <12 месяцев. Прерывистая линия разделяет зоны с разным прогнозом для подгрупп А (слева внизу) и В (справа вверху)

подгруппа В=0,42; МВ=31,5 месяца; n=14 человек) с медленным темпом смертности ($\lambda = 0,022$ в мес.).

Предельная продолжительность жизни у А-пациентов была меньше 12 мес., а у В—пациентов-120 мес. Один пациент (С), проживший более 10 лет отнесен к ошибке выборки.

Цитокинетические параметры. Рис. 2 показывает, как содержание CD34 и митозов (Мт) в периферийных лимфоцитах до лечения достоверно (с $p < 0,001$ и $p=0,05$) снижалось по мере сокращения ПЖ. Произведение параметров CD133+ГСК и Мт ($PA = \% Мт \times \% CD133$), принятое как показатель регенераторной активности (РА) обнаруживало 4,5-кратное снижение с высокой вероятностью $p < 0,001$.

Таким образом, только 2 параметра оказались надежно связанными с ПЖ—CD34+ГСК и РА.

Зависимость РА от CD34+ГСК на Рис.3 линией представлена с двумя ветвями и многочленом второго порядка ($y=12,8x^2+0,86x+0,017$; $p < 0,001$).

Левая и правая ветви (точечные линии) достоверны по отдельности ($PA=1E-06x^{-2,08}$; $p=0,002$ и $PA=2,4x^{1,92}$ $p=0,013$ соответственно). Значения РА в правой ветви находятся в прямой зависимости от величины CD34+ГСК и все ее точки принадлежат пациентам, которые имели ПЖ ≥ 12 месяцев (подгруппа В). В левой ветви

значения А обратно зависят от CD34+ГСК, и все принадлежат коротко живущим пациентам с ПЖ меньше, чем 12 месяцев (подгруппа А). В пределах каждой из ветвей положение точек на рис. 3 не упорядочены, что отражает кинетическую турбулентность параметров, показанных на рис. 2. В подгруппе короткоживущих А турбулентность более выражена. Так, коэффициенты вариации (КВ) для четырех параметров (CD34, Мт, CD133 и РА) в подгруппе с ПЖ <12 мес. выше, чем КВ у тех, ПЖ которых ≥ 12 мес., в 1,5-2,2 раза согласно точного теста Фишера с $p=0,014$. Эта повышенная турбулентность репродуктивной потенции костного мозга в течение последнего года жизни совпадает с уменьшением среднего содержания CD34+ГСК, Мт и РА в 2,0 2,0 и 2,5 раза $sp < 0,001$, 0,002 и 0,003 соответственно по сравнению с подгруппой В.

Тем не менее, у всех пациентов большинство параметров среднего содержания сохраняются на уровне выше контрольного. В подгруппе В с ПЖ ≥ 12 , CD34, РА и Мт повышены в 1,8 ($p < 0,001$), 5,4 ($p < 0,001$) и 7,8 раза ($p < 0,001$). В подгруппе А с ПЖ <12 превышение над контролем менее выражено: для РА в 2 ($p=0,05$) и для Мт в 4,4 ($p=0,001$) раза. Кроме того, только в этой подгруппе количество CD133+ ГСК было достоверно снижено в 1,8-раза по сравнению с контрольными значениями ($p=0,009$), тогда как в

подгруппе В некоторое снижение не подтвердилось статистически. Таким образом, ухудшение прогноза для 21 (подгруппа А) из 35 пациентов связано с тем, что аномальное увеличение РА и CD34+ СГК при благоприятном прогнозе сменяется их 2-кратным ослаблением, хотя ослабление относительное, и превышение РА над контролем сохраняется, а CD34+СГК снижается до контрольного уровня. Зоны расположения точек для подгрупп А и В разделены на рис. 3 четко выраженной границей (прерывистая линия), что позволяет оценить специфичность и избирательность прогноза ПЖ <12 мес. близкими к 100% согласно тесту 2×2 таблицы. Различия медиан выживаемости в подгруппах А и В составили 4,6 и 31,5 мес.

Обсуждение

С возрастом после 85 лет заболеваемость, смертность и распространенность 23 главных типов злокачественной патологии человека прогрессивно снижаются [4]. Факт одновременного ослабления агрессивности злокачественного процесса и возрастной инволюции лимфоидного ростка кроветворения [8], несовместим с доктриной противоракового иммунитета, но вполне объясним с позиций морфогенного/трофического влияния циркулирующих лимфоидных ГСК на клеточное обновление как в нормальных, так и в злокачественных тканях организма [12]. Турбулентность является неотъемлемой частью гемопозитического синдрома и смерти при воздействии на организм радиации или радиомиметиков. Причиной синдрома и турбулентности являются аномально высокие (избыточные) потери пролиферирующих клеток, включая наиболее уязвимые пулы СГК и лимфоцитов [3]. Степень амортизации пролиферативного ресурса ГСК, имитируемого в нашем исследовании параметром РА, зависит от частоты и напряженности регенераторно-репарационных процессов, в которые вовлекались ГСК в предыдущий период. Частота отказов кроветворения многократно возрастает во времени, особенно при наличии злокачественного роста. Из представленных данных следует, что поддержание относительно приемлемого исхода лечения требует от организма сохранять лимфоцитопоз на аномально высоком уровне пролиферативного напряжения. Последующий срыв этого режима даже до квазинормальных величин продукции клеток ведет к быстрому-менее года—полному исчерпанию ресурса системы и смерти организма.

Мы предполагаем, что избыточное трофическое обеспечение морфогенными клетками пролиферации в злокачественной и одновременно в нормальных тканях может быть основной при-

чиной сокрушения ПЖ, тогда как в заключительном периоде жизни синдром старческой немощи и собственно смерть остаются подобными при раке и естественном старении [17].

Морфообразующие мигрирующие клетки включают плюрипотентные и ангиогенные CD133 + ГСК, CD34+ ГСК-предшественники, клетки, эмигрирующие из тимуса на стадии ТdT-позитивных прелимфоцитов (с терминальной дезокси-нуклеотидилтрансферазой), CD31 ангиогенные Т-лимфоциты и некоторые другие молодые клетки, которые принято классифицировать как «регуляторные» [5, 14, 10].

События, связанные с избыточной репопуляцией тканей, приводят к ускоренной амортизации лимфопоэтического ресурса и увеличению смертности вследствие не только чрезмерного количественного расходования ГСК для процессов тканевого восстановления, но и вследствие ослабления митотического потенциала каждой клетки ГСК, жизнь которой варьирует от 10 до 60 месяцев по мере укорочения теломер при очередном митозе [17]. При наличии рака потери СГК, намного превышающим усредненные для условно здоровых людей $\approx 1,4\%$ за год, и сбоя системы возникает гораздо раньше, чем при иной соматической патологии, за исключением воздействия радиации или радиомиметиков, к которым гемо—и, особенно, лимфоцитопоз имеют наивысшую избирательную чувствительность.

Признаки функционального износа лимфоцитопоза в обеих подгруппах представлены патологической (турбулентной/ симметричной) продукцией клеток, более выраженной в подгруппе короткоживущих с ПЖ <12 месяцев (рис. 2).

Ухудшению прогноза сопутствовала качественная инверсия положительной взаимосвязи между CD34+ГСК и РА на отрицательную (рис. 3). Инверсия обусловлена неспособностью лимфоцитопоза поддерживать однонаправленное продуцирование CD34 +, CD133 + ГСК и митотических клеток Мт по сравнению с тем, как это происходит в подгруппе долгоживущих.

Более глубокий уровень истощения у короткоживущих пациентов проявляется и в увеличении у них степени турбулентности (показатели КВ). Турбулентность возникает на фоне так называемого несимметричного типа деления клеток, который характерен для нормального стационарного состояния. Первоначальная фаза гиперактивности турбулентного позза с 2-8 кратным увеличением средних показателей в подгруппе долго живущих (ПЖ > 12 мес.), постепенно количественно истощает лимфоцитопозитический ресурс (РА), но затем она быстро (ПЖ <12 мес.) трансформируется в сбой системы воспроизводства клеток, при котором качественно изменя-

ются соотношения митотической активности и ГСК-субпопуляций [15]. Эти изменения находят отражение и в более зрелых пулах циркулирующих клеток. Как было показано нами ранее, успех цитотоксической терапии в терминах ПЖ сопряжен с ограниченной индуцированной лимфоцитопенией, без которой любой вид терапии не эффективен. Однако, положительный эффект цитотоксического лечения трансформируется в негативный, если исходное количество лимфоцитов в крови больного ниже допустимого лимита [13]. Поэтому в настоящей работе нельзя исключить наличие в подгруппе А короткоживущих пациентов, получивших цитотоксическое лечение, избыточное применительно к их исходно истощенному лимфоцитопозу [1].

Заключение

Двойственность цитотоксического лечения заключается в однонаправленном повреждении репродуктивных систем опухоли и HSC, которые контролируют ПЖ противоположным образом. Баланс между противоопухолевой и антимитотической активностью лечения ухудшается со временем, прошедшим с момента начала заболевания или его терапии. Чем больше «терапевтических» курсов у пациента, чем агрессивнее течение злокачественного процесса и чем ближе врожденная склонность пациента к минимальному варианту популяционного распределения кроветворного ресурса, тем менее устойчива к дополнительным нагрузкам (рак, болезни, цитотоксическая терапия) его система воспроизводства ГСК, ответственная за клеточное обновление всех быстро пролиферирующих тканей и, в конечном итоге, за жизнеспособность. Соответственно, пролиферативный ресурс кроветворения, особенно его лимфоидного звена, является базой для разработки эффективного индивидуального прогноза результатов лечения агрессивных форм рака.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baker H. Overtreatment in stage IV lung cancer in the USA // *The Lancet Oncology*.—2015. —Vol. 16 (15). —P. e532. —DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00383-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00383-6).
2. Drapeau C. Cracking the stem cell code: demystifying the most dramatic scientific breakthrough of our times. // Goodwill Books USA, Sutton Hart Press / 1st. ed., 2010. Hillsboro, Or -2010. —450 p.
3. Fliedner T. M., Graessle D. Hematopoietic cell renewal systems: mechanisms of coping and failing after chronic exposure to ionizing radiation // *Radiation and Environmental Biophysics*.—2008. —Vol. 47 (1). —P. 63–69.
4. Harding C., Pompei F., Wilson R. Peak and decline in cancer incidence, mortality, and prevalence at old ages

// *Cancer*.—2012.—Vol. 118.—P. 1371–1386.—doi: 10.1002/cncr.26376.

5. Hur J., Yang H.-M., Yoon C.-H. et al. Identification of a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis. Characterization of endothelial progenitor cell colonies // *Circulation*.—2007.—Vol. 116 (15).—P. 1671–1682.
6. Koh Y.W., Choi J.-H., Ahn M.S. et al. Baseline neutrophil–lymphocyte ratio is associated with baseline and subsequent presence of brain metastases in advanced non-small cell lung cancer // *Sci. Rep.*—2016.—Vol. 6.—P.38585.—doi: 10.1038/srep38585.
7. Liesveld J. L., Rubin Ph., Constine L.S. Hematopoietic system, in: *Adverse late effects of cancer treatment. Vol.2: Normal tissue specific sites and systems*. Eds. Rubin Ph., L., Constine S., Marks L. B. // Springer Verlag -Heidelberg, Germany, 2014.—P. 623–656.—doi: 10.1007/978-3-540-75863-1.
8. Pang W.W., Price E.A., Sahoo D. et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age // *PNAS*.—2011.—Vol. 108 (50).—P. 20012–20017.—<https://doi.org/10.1073/pnas.1116110108>.
9. Sales-Pardo I., Avenda o A., Martinez-Mu oz V. et al. Flow cytometry of the side population: tips and tricks // *Cellular oncology*.—2006.—Vol. 28 (1-2).—P. 37–53.—<http://dx.doi.org/10.1155/2006/536519>.
10. Shoutko A., Ekimova L., Mus V., Sokurenko V. Fluctuations of CD34 cells number in blood of cancer patients during final year of life // *Medical and Health Science Journal (MHSJ) Acad. Publ. Platform*.—2012.—Vol. 13(4).—P. 7–13.—doi: <http://dx.doi.org/10.15208/mhsj.2012.52>.
11. Shoutko A.N., Ekimova L.P. Lymphocytopenia can contribute in common benefit of cytotoxic therapy of cancer // *Inter -Medical*.—2014.—Vol. 3.—P. 5–13.—[http://www.inter-medical.ru/files/Archiv/26-27](http://www.inter-medical.ru/files/Archiv/26-27http://www.inter-medical.ru/files/Archiv/26-27)<http://www.inter-medical.ru/files/Archiv/26-27>
12. Shoutko A.N., Ekimova L.P. The impact of middle age on the viability of patients with nonmalignant and malignant diseases // *Cancer Research Journal*.—2014.—Vol. 2(6).—P. 114–120.—doi: 10.11648/j.crj.20140206.14.
13. Shoutko A.N., Yurkova L.E., Borodulya K.S., Ekimova L.P. Lymphocytopenia and cytotoxic therapy in patients with advanced ovarian cancer // *Cancer Research Journal*.—2015.—Vol. 3(3).—P.47–51.—doi: 10.11648/j.crj.20150303.
14. Shoutko A.N., Gerasimova O.A., Ekimova L.P. et al. Long-term activation of circulating liver-committed mononuclear cells after OLT // *J. J. Regener Med*.—2016.—Vol. 1 (3). —P. 011.
15. Shoutko A.N., Gerasimova O.A., Ekimova L.P. et al. Lymphocyte reproductive activity normalized to numbers of hematopoietic stem cells in blood and rate of death in fatal diseases // *International Journal of Genetics and Genomics*.—2017.—Vol. 5(5).—P. 54–62.—doi: 10.11648/j.ijgg.20170505.12.
16. Shoutko A.N., Yurkova L.E., Borodulya K.S. et al. Competitive principal of tumor control in radiological clinic // *Radiol Diagn Imaging*.—2017.—Vol. 1(2).—P. 1–2.—doi: 10.15761/RDI.1000107.
17. Sieburg H.B., Cattarossi G., Muller-Sieburg C.E. Lifespan differences in hematopoietic stem cells are due to imperfect repair and unstable mean-reversion // *PLoS Comput Biol*.—2013.—Vol. 9 (4).—P. e1003006.—doi:10.1371/journal.pcbi.1003006.

18. Woolhouse I., Bishop L., Darlison L. et al. British Thoracic Society Guideline for the investigation and management of malignant pleural mesothelioma // *BMJ Thorax*.—2018.—Vol. 73.—P. i1-i30.—doi: 10.1136/thoraxjnl-2017-211321.

A.N. Shoutko, V.F. Mus

**Life span prediction at metastatic
non-small cell lung cancer**

A.M. Granov Russian Scientific Center for Radiology
and Surgical Technologies
St. Petersburg

Individual parameters of circulating hemopoietic stem cells (HSC) lymphoid origin were measured by cytofluorometry before treatment of patients with metastatic non-small cell lung cancer and were retrospectively compared with individual life span's (LS). The possibility of poor prognosis of treatment's results (LS <1 year) with the specificity and selectivity close to 100% is shown.

Key words: lung cancer, hematopoietic stem cells, prediction, life span