

*С.В. Миллер¹, Е.О. Родионов^{1,2}, С.А. Тузииков^{1,2}, Л.А. Ефтеев¹, Е.Л. Юмов³,
М.М. Цыганов¹, Н.В. Литвяков^{1,4}, И.Г. Фролова¹, Н.В. Чердынцева^{1,4}, С.А. Величко¹,
А.В. Гольдберг¹*

Комбинированное лечение местнораспространенного немелкоклеточного рака легкого и молекулярные аспекты химиорезистентности

¹НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Томск,

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск,

³ГБУЗ «Бурятский республиканский клинический онкологический диспансер», Улан-Удэ,

⁴Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск

Проведен анализ результатов лечения 68 пациентов НМРЛ III стадии, из которых в основную группу включено 36 пациентов с проведением курсов периоперационной химиотерапии по схеме винорелбин / карбоплатин и радикальное оперативное лечение. В контрольную группу вошли 32 больных, которым выполнено только хирургическое лечение. Была изучена взаимосвязь экспрессии генов монорезистентности и множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) с клинико-морфологическими параметрами опухолевого процесса и с частотой отдаленного метастазирования.

Результаты. Показатель трехлетней безрецидивной и общей выживаемости в основной группе составил $60,0 \pm 13,8\%$ и $80,0 \pm 8,5\%$, в группе контроля - $35,7 \pm 25,4\%$ и $50,0 \pm 18,9\%$ соответственно. Установлена связь экспрессии изученных генов МЛУ и монорезистентности с основными клинико-морфологическими параметрами пациентов и с частотой метастазирования.

Заключение. Полученные результаты исследования показывают более высокую эффективность комбинированного лечения НМРЛ за счет значимого уменьшения количества отдаленных метастазов и местных рецидивов и, соответственно, улучшения показателей общей и безрецидивной выживаемости. Гены монорезистентности и гены МЛУ играют важную роль в формировании химиорезистентности НМРЛ, поэтому исследование уровня экспрессии этих генов является важным для планирования персонализированного лечения.

Ключевые слова: комбинированное лечение, немелкоклеточный рак легкого, неоадьювантная химиотерапия, химиорезистентность, гены монорезистентности, АВС-транспортеры

Введение

Наиболее распространенной злокачественной опухолью во всем мире является рак легкого, занимая лидирующие позиции по смертности среди всех онкологических заболеваний [3, 7].

Хирургическое вмешательство является единственным радикальным методом лечения и остается ведущим в терапии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) [1, 2]. Однако пятилетняя выживаемость больных НМРЛ для стадии IIIA, которые перенесли хирургическое вмешательство, составляет не более 25% [2].

Стоит также отметить, что у больных немелкоклеточным раком легкого III стадии существует высокая вероятность циркулирующих субклинических отдаленных метастазов, за счет чего нивелируется эффективность локорегионарного лечения и требуется назначение системной химиотерапии [2, 10]. Для оптимизации выбора химиотерапевтических агентов необходим поиск новых маркеров, учитывающий их фармакокинетику и фармакодинамику, а также индивидуальные молекулярно-генетические особенности НМРЛ [9]. Данный подход является мировым трендом развития лекарственной терапии злокачественных новообразований.

Феномен химиорезистентности является важнейшим ограничением системной химиотерапии рака легкого и обусловлен высоким уровнем экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), которые определяют около 75-85% случаев низкой эффективности конвенциональной химиотерапии [4]. Кроме генов МЛУ, ответ опухоли на химиотерапию связан с экспрессией генов монорезистентности, определяющих в свою очередь устойчивость/чувствительность только к отдельным химиопрепаратам [7, 11].

Таким образом, целью исследования является разработка новой программы комбинированного лечения операбельного немелкоклеточного рака легкого III стадии и оценка связи экспрессии генов монорезистентности и МЛУ с эффектом предоперационной химиотерапии, общей и безрецидивной выживаемостью в клинических условиях.

Материалы и методы

В исследование включено 68 больных немелкоклеточным раком легкого III стадии. В основную группу вошли 36 пациентов, которым проведено два курса неoadъювантной химиотерапии препаратами винорелбин и карбоплатин, радикальное хирургическое вмешательство и послеоперационная химиотерапия по той же схеме. В контрольную группу было включено 32 пациента, которым выполнено радикальное оперативное лечение без проведения химиотерапии.

Состав больных по полу, форме роста опухоли, возрасту, локализации, клинической стадии процесса и морфологическому типу опухоли был сопоставим. средний возраст больных составил 57±2 лет.

Первым этапом комбинированного лечения НМРЛ больным основной группы проводилась предоперационная химиотерапия по схеме: винорелбин / карбоплатин в количестве 2 курсов с интервалом между курсами 3 недели.

Радикальное хирургическое вмешательство являлось основным этапом проводимого лечения пациентов обеих групп. В обязательном порядке выполнялась ипсилатеральная медиастинальная лимфодиссекция. При сравнении групп больных по объемам оперативного вмешательства статистически значимых различий не получено (p>0,05). Распределение больных показано в табл. 1.

Через 3-4 недели после операции больным основной группы было проведено 3 курса химиотерапии по той же схеме - винорелбин \ карбоплатин. Интервал между курсами химиотерапии составлял 3 недели (получен патент РФ №2455986 от 20.07.2012).

Материалом для молекулярно-генетического исследования служили не измененная ткань бронхов, паренхимы легких и опухолевая ткань, которые забирались во время оперативного вмешательства у больных основной группы. Образцы ткани помещали в раствор RNeasy lysis buffer (Ambion, USA), далее их сохраняли при температуре -80°C для дальнейшего выделения тотальной РНК. Тотальную РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini kit Plus, содержащего ДНКазу I (Qiagen, Germany). Уровень экспрессии генов 9 МЛУ: GSTP1, MVP, ABCB1-B2, ABCC1-C2, ABCC5, ABCG1-G2 и семи генов монорезистентности: TOP2A, BRCA1, RRM, ERCC1, TOP1, TYMS, TUBB3 оценивали с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (RT-qPCR) на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Australia) по технологии TaqMan [4].

Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни в программе Statistica 6.0. Для анализа безрецидивной и общей выживаемости использовались кривые выживаемости Каплана-Майера. Значимость различий между группами определялась с помощью Log-Rank test. Различия результатов по выживаемости исследуемых групп больных оценивались с использованием обобщенного критерия χ^2 . Различие считалось значимым при p < 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Объективный ответ опухоли после неoadъювантного лечения определялся с помощью шкалы RECIST 1.1. Выявлено, что частота объ-

Таблица 1. Основные клиничко-морфологические параметры исследуемых групп

Клиничко-патологический параметр		Основная группа (n=36)	Контрольная группа (n=32)
Возраст	≤50 лет	5 (13,9%)	8 (25,0%)
	>50 лет	31 (86,1%)	24 (75,0%)
Пол	Мужской	31 (86,1%)	29 (90,6%)
	Женский	5 (13,9%)	3 (9,4%)
Стадия TNM	T1-2N2M0	2 (5,5%)	19 (59,4%)
	T3N1-2M0	27 (75,0%)	13 (40,6%)
	T3N3M0	2 (5,5%)	0
	T4N0M0	1 (2,7%)	0
	T4N1-2M0	4 (11,1%)	0
Клиничко-анатомическая форма	Центральный	19 (52,8%)	17 (53,1%)
	Периферический	17 (47,2%)	15 (46,9%)
Гистологический тип	Плоскоклеточный	27 (75,0%)	19 (59,4%)
	Аденокарцинома	7 (19,4%)	13 (40,6%)
	Крупноклеточный рак	2 (5,6%)	0
Характер операции	Пневмонэктомия	18 (50,0%)	17 (53,1%)
	Лобэктомия	18 (50,0%)	15 (46,9%)

активного эффекта составила 25,0% (полная регрессия - 2,8% и частичная регрессия - 22,2%). Стабилизация процесса выявлена в 75% случаях (у 27 из 36 пациентов). При этом прогрессирования заболевания выявлено не было.

Гематологическая токсичность явилась частым осложнением при проведении химиотерапии (30,5±7,7%), преимущественно I-II степени выраженности. Таких осложнений, как фебрильная нейтропения и инфекционные осложнения, отмечено не было. Реже по частоте наблюдались такие осложнения, как тошнота и рвота (11,1±5,2%), гепатотоксичность (8,3±4,6%), нефротоксичность (8,3±4,6%), алопеция (11,1±5,2%). При этом развившиеся осложнения носили кратковременный и обратимый характер, не требовали увеличения интервала между курсами химиотерапии.

В послеоперационном периоде осложнения развились у 10 (14,7±4,3%) больных обеих групп, из них в основной группе у 5 больных (13,9±5,8%), в контрольной группе также у 5 пациентов (15,6±6,4%). Различия в количестве осложнений в изучаемых группах статистически незначимо ($p > 0,05$). После операции в контрольной группе умерли 2 пациента (6,3±4,3%). Причинами явились ТЭЛА и острый инфаркт миокарда. В основной группе летальных исходов не наблюдалось.

При оценке лекарственного патоморфоза после неoadьювантного лечения выявлено, что IV степень достигнута в 2 (5,6%) случаях, III степень – у 4 (11,1%) пациентов. В большинстве случаев (83,3%) выявлен патоморфоз I-II степени.

Срок наблюдения за больными составил три года, результаты лечения прослежены у 63 па-

циентов исследуемых групп. В основной группе с комбинированным лечением прогрессирование заболевания наблюдалось у 14 (40,0±8,3%) больных. У 9 (25,7±7,4%) пациентов выявлены отдаленные метастазы (в головной мозг у 6 пациентов и у 3 больных - метастазы в печень), у 2 (5,7±3,9%) больных - местный рецидив, а у 3 (8,6±4,7%) пациентов – сочетание рецидива и отдаленных метастазов. В группе контроля прогрессирование выявлено у 18 (64,3±9,1%) больных, из них в 11 (39,3±9,2%) случаях за счет отдаленного метастазирования, в 5 (17,9±7,2%) случаях возник местный рецидив, а у 2 больных (7,1±3,2%) – сочетанный рецидив и отдаленные метастазы. За трехлетний период наблюдения в группе комбинированного лечения умерло 7 больных, а в группе контроля - 14 больных.

Показатель трехлетней безрецидивной выживаемости в основной группе составил 60,0±13,8%, в группе контроля - 35,7±25,4%. При этом различия статистически значимы ($\chi^2 = 4,2$; $p < 0,05$). Общая трехлетняя выживаемость больных в группе комбинированного лечения составила 80,0±8,5%, в контрольной - 50,0±18,9%. Различия в сравниваемых группах также статистически значимы ($\chi^2 = 4,1$; $p < 0,05$) (рис. 1).

Следовательно, можно сделать вывод о более высокой эффективности разработанной программы комбинированного лечения НМРЛ за счет улучшения показателей безрецидивной и общей выживаемости в сравнении с группой хирургического лечения.

Была изучена связь клинико-морфологических параметров с экспрессией генов ABC-транспортеров и монорезистентности. Было выявлено, что у больных с местной распространенностью процесса T3-4 (TNM, 2009 г.) отмеча-

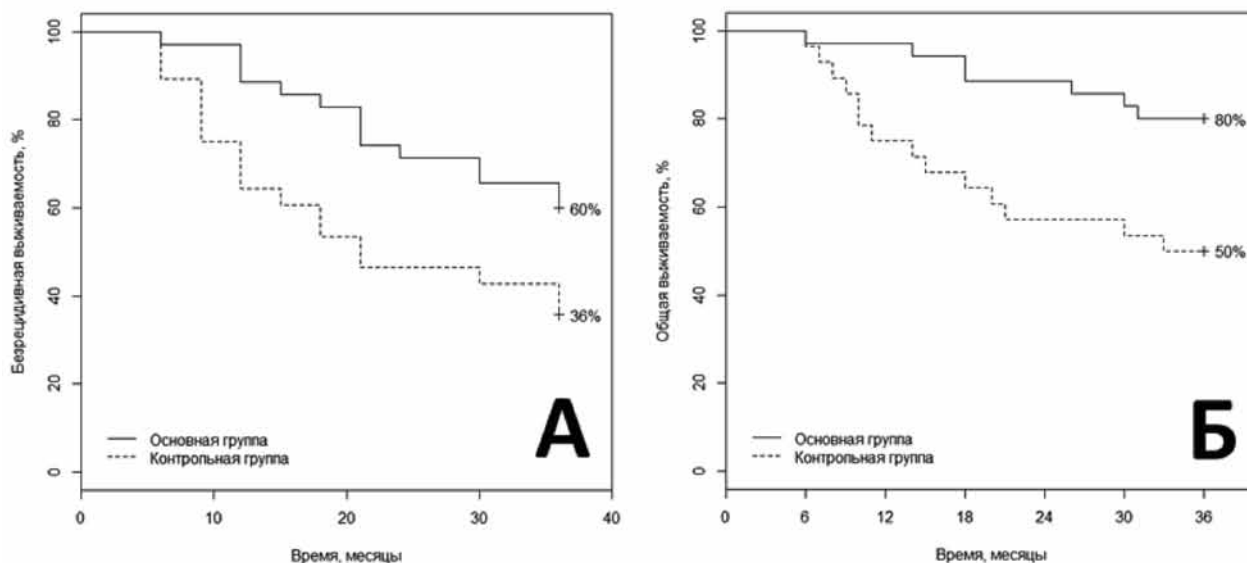


Рис. 1. Анализ трехлетней безрецидивной (А) и общей (Б) выживаемости по методу Каплана–Майера

лась статистически значимо сниженная экспрессия таких генов, как ABCG1 ($0,17 \pm 0,05$), ABCG2 ($0,16 \pm 0,06$) и ERCC1 ($0,13 \pm 0,03$) по сравнению с пациентами с распространенностью опухолевого процесса T1-2 ($0,42 \pm 0,17$; $0,58 \pm 0,36$ и $0,37 \pm 0,09$ соответственно, $p < 0,04$). Полученные результаты могут объяснить более высокую чувствительность опухоли больных с распространенностью T3-4 к химиотерапии, в особенности к препаратам платинового ряда, поскольку высокая экспрессия генов репарации (BRCA1, ERCC1) определяет устойчивость НМРЛ к препаратам платины [11]. При оценке экспрессии генов в зависимости от локализации опухоли, было вы-

явлено, что экспрессия генов TOP1 и MVP у пациентов с периферической локализацией опухоли легкого оказалась в 2-3 раза выше, чем при центральной локализации злокачественного процесса ($1,15 \pm 0,63$ против $0,32 \pm 0,13$, $p = 0,0401$; $0,82 \pm 0,26$ против $0,30 \pm 0,09$, $p = 0,0183$ соответственно). При оценке связи экспрессии изучаемых генов с морфологическим типом опухоли выявлено, что аденокарцинома легкого в сравнении с плоскоклеточной карциномой отличалась высокой экспрессией гена BRCA1 ($0,64 \pm 0,33$ против $0,17 \pm 0,05$, $p = 0,0192$), который обуславливает устойчивость к карбоплатину, а также высокой экспрессией генов MVP ($1,09 \pm 0,62$ против

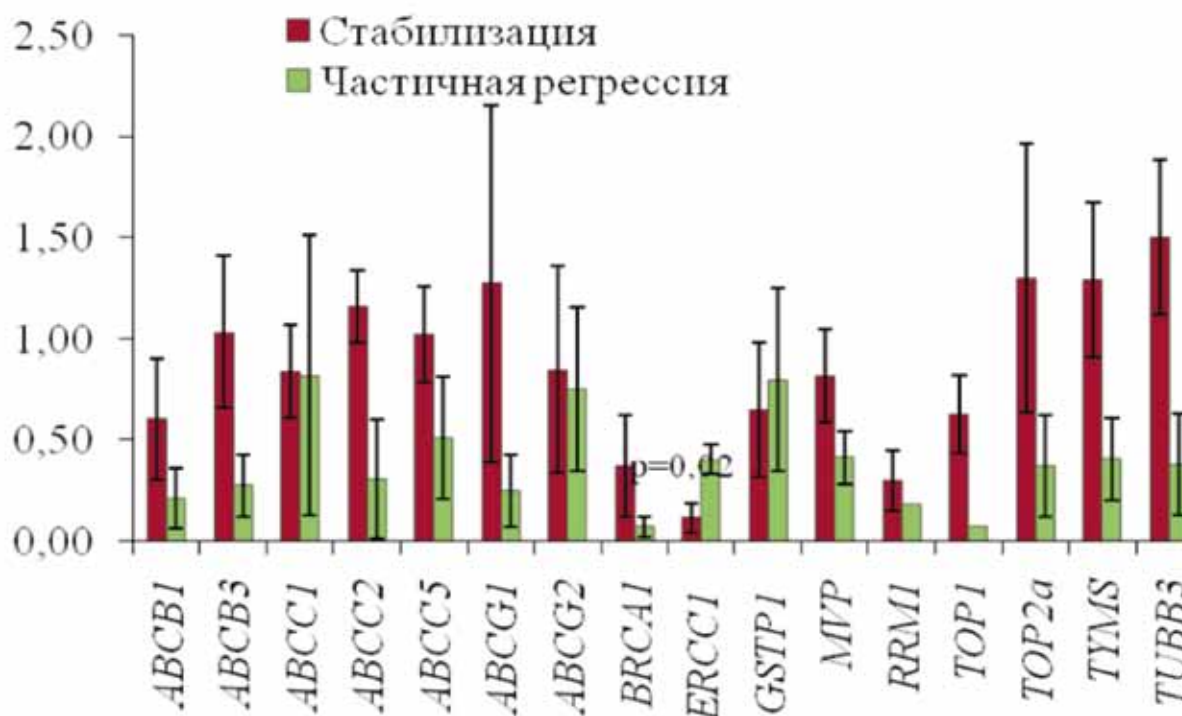


Рис. 2. Связь экспрессии генов монорезистентности и МЛУ в опухоли у больных НМРЛ с эффектом неoadъювантной химиотерапии

$0,30 \pm 0,08$, $p = 0,0236$), ABCB1 ($0,24 \pm 0,09$ против $0,10 \pm 0,03$, $p = 0,0417$) и TUBB3 ($2,21 \pm 1,08$ против $0,87 \pm 0,39$, $p = 0,0124$), отвечающих за резистентность к винорелбину [11]. Полученные данные могут объяснить феномен известной по литературе низкой чувствительности железистого рака легкого к конвенциональной химиотерапии по сравнению с плоскоклеточным раком [6].

После проведения неoadъювантной химиотерапии была оценена связь экспрессии генов монорезистентности и генов МЛУ в опухоли у больных со стабилизацией процесса и частичной регрессией. Так, у больных с частичной регрессией был достоверно выше уровень экспрессии гена ERCC1 ($p = 0,02$), по другим исследуемым генам статистически значимых различий не выявлено. Также выявлен низкий уровень экспрессии большинства генов монорезистентности

и генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли НМРЛ у больных с частичной регрессией по сравнению со стабилизацией процесса (для генов TYMS, ABCB1, ABCB2, ABCB3, ABCG1 отмечено снижение на уровне тенденции, $p < 0,1$) (рис. 2).

В проведенных ранее исследованиях у пациентов с раком молочной железы были получены аналогичные результаты. Показано, что для достижения эффекта НАХТ важным является направление изменения экспрессии, а не исходный уровень экспрессии генов МЛУ до лечения [8].

Был проведен анализ ассоциации генов монорезистентности и генов МЛУ с общей и безрецидивной выживаемостью. Показано, что у больных с метастатическим поражением экспрессия генов ABC-транспортеров GSTP1 ($0,75 \pm 0,13$ и $0,28 \pm 0,05$, $p = 0,0201$), ABCB2 ($1,82 \pm 0,81$

и $0,12 \pm 0,06$, $p=0,0338$), ABCG1 ($0,31 \pm 0,08$ и $0,11 \pm 0,04$, $p=0,0234$), ABCG2 ($0,70 \pm 0,26$ и $0,16 \pm 0,06$, $p=0,0390$), и генов монорезистентности TUBB3 ($1,21 \pm 0,24$ и $0,83 \pm 0,41$, $p=0,0172$) и TYMS ($0,35 \pm 0,06$ и $0,22 \pm 0,08$, $p=0,0734$) статистически значимо или на уровне тенденции ниже, чем в группе сравнения. С общей выживаемостью была выявлена ассоциация экспрессии только двух генов - TUBB3 ($1,14 \pm 0,22$ и $0,95 \pm 0,49$, $p=0,0715$) и ABCG1 ($0,29 \pm 0,07$ и $0,12 \pm 0,04$, $p=0,0380$).

Полученные результаты исследования во многом противоречат мировым исследованиям, в которых в большинстве случаев именно высокий уровень экспрессии генов ABC-транспортеров связывается с неблагоприятным прогнозом [5].

В проведенном исследовании также было выявлено, что уровень экспрессии гена GSTP1, превышающий значение 0,6, является благоприятным прогностическим признаком, который ассоциирован со 100% безрецидивной выживаемостью (Log-Rank test, $p = 0,0027$).

Заключение

Проведение неoadъювантной химиотерапии не ухудшает течение послеоперационного периода, при этом не отмечено тяжелых нежелательных явлений. Применение комбинированного метода лечения местнораспространенного НМРЛ статистически значимо уменьшает вероятность прогрессирования заболевания в сравнении с группой пациентов, получавших только хирургическое лечение: местные рецидивы и отдаленные метастазы выявлены в 40,0% и в 65,3% случаев соответственно. Установлена связь экспрессии генов ABCG1, ABCG2, ABCC2, TUBB3 и GSTP1 с частотой метастазирования. Показано, что уровень экспрессии гена GSTP1 более 0,6 является благоприятным прогностическим признаком, при котором наблюдается 100% выживаемость пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попова Н.О., Шаталова В.А., Симолина Е.И. и др. Клинический случай длительного лечения и наблюдения пациента с метастатическим раком легкого // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – Т. 4. – С. 75–77.
2. Трахтенберг А.Х., Колбанов К.И. Рак легкого // М.: ГЭ-ОТАР-Медиа, 2012. – С. 160.
3. Чойнзонов Е.Л., Жуйкова Л.Д., Ананина О.А. и др. Выживаемость больных раком легкого на территории Томской области (2004–2013 гг.) // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Т. 6(4). – С. 5–10.
4. Юмов Е.Л., Цыганов М.М., Литвяков Н.В. и др. Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости и монорезистентности при немелкоклеточном раке легкого // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – Т. 6(1). – С. 16–22.

5. Amiri-Kordestani L., Basseville A., Kurdziel K. et al. Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies // Drug Resistance Update. – 2012. – Vol. 15(1-2). – P. 50-61.
6. Douillard J., Rosell R., De Lena M. et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial // The Lancet Oncology. – 2006. – Vol. 7(9). – P. 719-727.
7. Huang Z-L., Cao X., Luo R-Z. et al. Analysis of ERCC1, BRCA1, RRM1 and TUBB3 as predictors of prognosis in patients with non-small cell lung cancer who received cisplatin-based adjuvant chemotherapy: A prospective study // Oncology Letters. – 2016. – Vol. 11(1). – P. 299-305.
8. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M. et al. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response // Cancer Chemotherapy and Pharmacology. – 2013. – Vol. 71. – P. 153–163.
9. Olausson K.A., Postel-Vinay S. Predictors of chemotherapy efficacy in non-small-cell lung cancer: a challenging landscape // Annals of Oncology. – 2016. – Vol. 27(11). – P. 2004–2016.
10. Postmus P.E., Kerr K.M., Oudkerk M. et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // Annals of Oncology. – 2017. – Vol. 28 (SUPPL_4). – P. iv1–iv21.
11. Su C., Zhou S., Zhang L. et al. ERCC1, RRM1, and BRCA1 Mrna expression levels and clinical outcome of advanced non-small cell lung cancer // Journal of Clinical Oncology. – 2010. – Vol. 28(15_suppl). – P. e18045-e18045.

Поступила в редакцию 11.01.2019 г.

*S.V. Miller¹, E.O. Rodionov^{1,2}, S.A. Tuzikov^{1,2},
L.A. Efteev¹, E.L. Yumov³, M.M. Tsyganov¹,
I.G. Frolova¹, N.V. Cherdyntseva^{1,4}, S.A. Velichko¹,
A.V. Gol'dberg¹*

Combined treatment of locally advanced non-small cell lung cancer and molecular aspects of chemoresistance

¹Cancer Research Institute, Tomsk NRCM, Tomsk,

²Siberian State Medical University, Tomsk,

³Buryat Republican oncological dispensary, Republic of Buryatia, Ulan-Ude,

⁴National Research Tomsk State University, Tomsk

We analyzed the results of treatment of 68 patients with NSCLC stage III, of which the main group included 36 patients with perioperative chemotherapy vinorelbine / carboplatin. The control group included 32 patients who underwent only surgical treatment. The correlation of monoresistance and multidrug resistance (MDR) genes expression with clinical and morphological parameters of tumor process and with the frequency of distant metastasis was studied.

Results. The three - year relapse-free and overall survival in the study group was $60.0\pm 13.8\%$ and $80.0\pm 8.5\%$, in the control group- $35.7\pm 25.4\%$ and $50.0\pm 18.9\%$, respectively. The relationship between the expression genes of the studied MDR genes and monoresistance with the main clinical and morphological parameters of patients and the frequency of metastasis was established.

Conclusion. The results of the study show a higher efficiency of combined treatment of NSCLC due to a significant reduction in the number of long-term metastases and local recurrences and, accordingly, improved overall and relapse-free survival. Monoresistance anMDR genes play an important role in NSCLC chemoresistance, so the study of the expression level of these genes is important for the planning of personalized treatment.

Key words: combined treatment, non-small cell lung cancer, neoadjuvant chemotherapy, chemoresistance, monoresistance genes, ABC-transporters